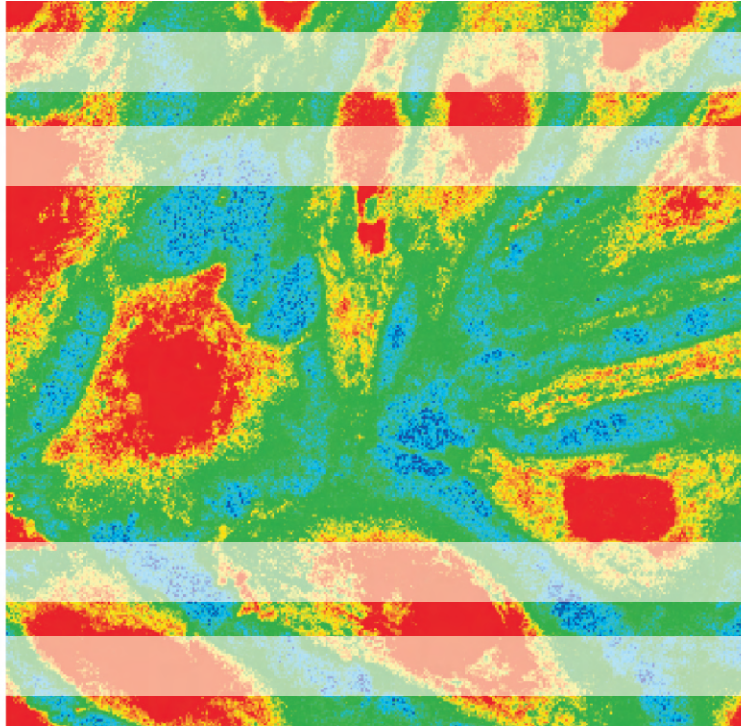
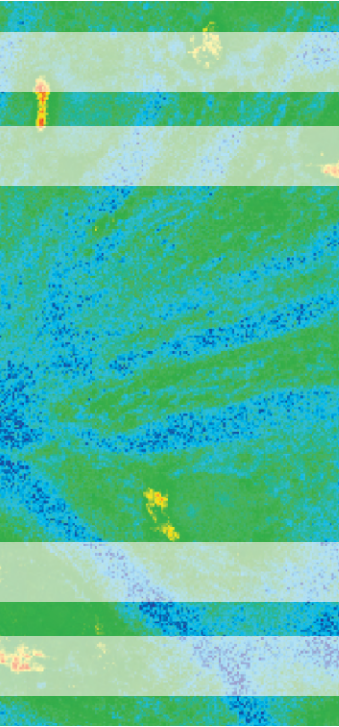


DIRK BAHDE

**MECHANISMUS DER Ca^{2+} -FREISETZUNG AUS DEM
ENDOPLASMATISCHEN RETIKULUM METABOLISCH
GEHEMMTER ENDOTHELZELLEN**



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

und

dem Institut für Physiologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Priv. Doz. Dr. Thomas Noll

Mechanismus der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum metabolisch gehemmter Endothelzellen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Dirk Bahde

Tierarzt aus Dorsten

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. M. Diener
PD Dr. T. Noll

Tag der Disputation: 12. November 2009

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen.....	5
---	----------

1. Einleitung.....	8
---------------------------	----------

1.1 Das Gefäßendothel.....	8
1.2 Das Endothel als funktionelle Schranke.....	8
1.3 Wirkung von Hypoxie und / oder Ischämie auf die $[Ca^{2+}]_i$ -Homöostase der Endothelzellen.....	10
1.4 Einstrom von Ca^{2+} -Ionen.....	10
1.5 Das endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien als intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher.....	12
1.5.1 Das endoplasmatische Retikulum.....	12
1.5.2 Die Mitochondrien.....	14
1.6 Store-operated calcium entry.....	15
1.7 Ziel der Arbeit.....	16

2. Material und Methoden.....	18
--------------------------------------	-----------

2.1 Chemikalien.....	18
2.2 Puffer und Kulturmedien.....	19
2.3 Isolierung und Kultivierung makrovaskulärer Endothelzellen aus der Schweineaorta.....	20
2.4 Bestimmung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration.....	21
2.5 Messung der interendothelialen Lückenbildung.....	22
2.6 Bestimmung des Ca^{2+} -Einstroms.....	23
2.7 Zellulärer ATP-Gehalt.....	23
2.8 Experimentelle Protokolle.....	24
2.9 Statistische Analyse.....	24

3. Ergebnisse.....	25
3.1 Endothelzellen reagieren auf die simultane Zugabe von Natriumcyanid und 2-Desoxyglukose mit Änderungen in der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und der Bildung interendothelialer Lücken.....	25
3.2 Wirkung von 2-Desoxyglukose auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration.....	27
3.3 Einfluss von Pyruvat auf den 2-Desoxyglukose-induzierten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration.....	28
3.4 Wirkung von Natriumcyanid auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration.....	29
3.5 Einfluss von Glukose auf den Natriumcyanid-induzierten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration.....	30
3.6 Metabolische Hemmung von Endothelzellen auf Aortensegmenten.....	31
3.7 Änderungen der zytosolischen ATP-Konzentration in metabolisch gehemmten Endothelzellen.....	33
3.8 Einfluss der metabolischen Hemmung auf den Ca^{2+} -Einstrom	36
3.9 Wirkung einer Vorbehandlung der Endothelzellen mit Thapsigargin auf den 2-Desoxyglukose-induzierten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration....	40
3.10 Wirkung von Thapsigargin auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration bei simultaner Zugabe mit 2-Desoxyglukose.....	41
3.11 Einfluss von Thapsigargin auf den Ca^{2+} -Einstrom in 2-Desoxyglukose-behandelte Endothelzellen.....	43
3.12 Wirkung von Cyclopiazonsäure auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration bei simultaner Zugabe mit 2-Desoxyglukose.....	45
3.13 Einfluss von Xestospongin C auf den zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg in metabolisch gehemmten Endothelzellen.....	48
3.14 Einfluss von Ryanodin auf den zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg in metabolisch gehemmten Endothelzellen.....	50
3.15 Einfluss von Xestospongin C auf die interendotheliale Lückenbildung nach metabolischer Hemmung.....	50

4. Diskussion.....	52
5. Zusammenfassung.....	66
6. Summary.....	68
7. Literatur.....	70

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	zweiwertige(s) Calciumion(en)
CaCl ₂	Calciumchlorid
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
CPA	Cyclopiazonsäure
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(-β-aminoethylenether)-N,N,N,N-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
FAD	Flavinadenindinucleotid
FKS	fötales Kälberserum
Fura 2	1-(2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy)-2-2'-anino-5'-methylphenoxy-ethan-N,N,N,N-tetraazetsäure-natriumsalz
Fura 2 AM	Pentaazetoxymethyl-ester von Fura 2
g	Erdbeschleunigung
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
Gluc	Glukose
GLUT	Glukosetransporter
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat

IP ₃ R	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
IU	Internationale Einheiten (International Units)
K ₂ CO ₃	Kaliumkarbonat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
M	mol / l
M 199	Medium 199
mM	Millimol / l
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μM	Mikromol / l
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mn ²⁺	zweiwertige(s) Manganion(en)
MnCl ₂	Manganchlorid
min	Minute(n)
ms	Millisekunden
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaCN	Natriumcyanid
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid
nm	Nanometer
nM	Nanomol / l
n.s.	nicht signifikant verschieden
NKS	Neugeborenen Kälberserum
P	Signifikanzniveau
PAF	platelet-activating factor
PCA	Perchloroessigsäure
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration
Pyr	Pyruvat
RyR	Ryanodinrezeptor
SAM	sterile motif-α
SE	Standardabweichung

SOC	store-operated calcium entry
STIM1	Stromal-interacting protein 1
THG	Thapsigargin
TRP (-Kanal)	transient receptor potential (channel)
XeC	Xestospongin C
vs.	versus
2-DG	2-Desoxy-D-glucose (im Text 2-Desoxyglukose)
$[Ca^{2+}]_i$	zytosolische freie Calciumionenkonzentration
%	Prozent
% (v / v)	Volumenprozent
% (w / v)	Gewichtsprozent

1. Einleitung

1.1 Das Gefäßendothel

Das Gefäßendothel wird als eigenständiges Organ betrachtet, das in einer einschichtigen Lage die Blutgefäße auskleidet. Als Grenzschicht zwischen Blut und Gewebe nimmt das Endothel physiologisch wichtige Aufgaben wahr. So steuert es den Gefäßtonus und den Blutfluss durch vasoaktive Mediatoren (Furchgott und Vanhoutte, 1993; Pohl und Kaas, 1994; Zeither, 1994), übernimmt essentielle Funktionen bei der Blutgerinnung und verhindert das Anheften von Thrombozyten an die Oberfläche des Endothels. Endothelzellen sind an der Immunantwort beteiligt (Cotran, 1987) und regeln die Gefäßreparatur und die Angiogenese (Jaffe et al., 1987). Sie exprimieren für verschiedene Agonisten (z.B. Adenosinnukleotide und atriales natriuretisches Peptid) und inflammatorische Mediatoren (z.B. Thrombin, Histamin und Bradykinin) Rezeptoren. Viele vasoaktive Substanzen, z.B. Stickstoffmonoxid, „endothelial cell-derived hyperpolarisation factor“ (EDHF), Endothelin und Prostazyklin (Pearson et al., 1983; Van Coevorden und Boeynaems, 1984; Martin et al., 1985; Epstein, 1990) werden von Endothelzellen selbst synthetisiert.

1.2 Das Endothel als funktionelle Schranke

Das Endothel stellt eine selektive Barriere zwischen Gefäßlumen und Interstitium dar, die aktiv ihre Permeabilität ändern kann und so den Transport und Austausch von Nährstoffen und Metaboliten reguliert (Rippe und Haraldsson, 1994; Michel, 1996). Kleine wasser- oder lipidlösliche Moleküle gelangen dem Diffusionsgradienten folgend transzellulär durch die Endothelzellschicht. Makromoleküle können via zytoplasmatischer Vesikel aktiv durch die Endothelzellen geschleust werden und niedermolekulare Bestandteile des Plasmas und Makromoleküle passieren parazellulär im Bereich der Zell-Zell-Kontakte das Endothel (Majno und Palade, 1961; Nagy et al., 2008).

Geraten die Endothelzellen unter pathophysiologischen Bedingungen, wie Hypoxie oder Ischämie, in ein Energiedefizit, wird schon früh ein Versagen dieser endothelialen Schrankenfunktion beobachtet (Noll et al., 1995). Die daraus resultierende Hyperpermeabilität hat eine Extravasation von Makromolekülen und damit die Entstehung eines perivaskulären Ödems zur Folge, was entscheidend die Organfunktion behindert (Sunnergren und Rovetto, 1987).

Ursachen für das Versagen der endothelialen Schranke

Als mögliche Ursachen für das Schrankenversagen der Endothelzellschicht unter metabolischer Hemmung werden sowohl exogene als auch endogene endotheliale Faktoren diskutiert. Zu den exogenen Faktoren zählen Entzündungsmediatoren, wie z.B. Thrombin, Histamin und Bradykinin (Svensjo et al., 1979; Rotrosen und Gallin, 1986; Morgan Boyd et al., 1987; Lum et al. 1992; Garcia et al., 1995). Weitere exogene Faktoren sind Adenosin, Stickstoffmonoxid sowie Sauerstoffradikale, die z.B. aus aktivierten Granulozyten freigesetzt werden (Kubes und Granger, 1992; Watanabe et al., 1992; Kubes, 1993; Granger und Korthuis, 1995). Verschiedene Studien an salinperfundierten Herzen (Sunnergren und Rovetto, 1987; Svendsen et al., 1991), wie auch mit kultivierten Endothelzellen (Watanabe et al., 1992; Ladilov et al., 1997 und 2000; Schäfer et al., 2003) zeigten jedoch die herausragende Bedeutung endogener Faktoren für das Versagen der endothelialen Barriere. Als wesentliche endogene Faktoren gelten der Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), des zyklischen AMP (cAMP), des zyklischen GMP (cGMP) und die nachgeschalteten Proteinkinasen A, C und G.

Wirkung des zytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs auf die Endothelbarriere

Der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg in Endothelzellen hat eine Steigerung der Permeabilität durch Beeinflussung des kontraktilen Apparats (Curry, 1992) und durch Desorganisation des Zytoskeletts und der Zell-Zell-Kontakte zur Folge (Kuhne et al., 1993; Muhs et al., 1997). Diese Ca^{2+} -induzierten Prozesse sind die Ursache für das Lösen der Zell-Zell-Adhäsionstrukturen und der Retraktion der Endothelzellen, woraus das Versagen der Endothelschranke resultiert. Als morphologisches Korrelat dieser

Strukturänderungen des Endothelzellverbandes ist die Bildung interendothelialer Lücken zu sehen. Außerdem findet unter metabolischer Hemmung eine gesteigerte Synthese vasoaktiver Substanzen statt, wie die vasodilatierenden Mediatoren Stickstoffmonoxid, EDHF, Prostazyklin (PGI_2) und das vasokonstriktorisches Endothelin-1 (Newby et al., 1990; Busse et al., 1993; Furchgott und Vanhoutte, 1993).

1.3 Wirkung von Hypoxie und / oder Ischämie auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Homöostase der Endothelzellen

Wie in anderen Zellen auch, wird $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Endothelzellen in engen Grenzen konstant gehalten. Verantwortlich dafür sind ATP-abhängige Transportmechanismen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und der Plasmamembran. Zu einem Entgleisen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Homöostase kommt es z.B., wenn Endothelzellen durch Mediatoren wie Thrombin oder Histamin stimuliert werden (Carson et al., 1989; Garcia et al., 1995) oder mechanischen Reizungen ausgesetzt werden (Ando et al., 1988; Shen et al., 1992). Einen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg zeigen Endothelzellen aber auch, wenn sie unter hypoxischen und / oder ischämischen Bedingungen in ein Energiedefizit geraten. In dieser Situation nimmt der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg einen biphasischen Verlauf (Noll et al., 1995; Muhs et al., 1997). Welche molekularen Mechanismen dafür verantwortlich sind, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Ca^{2+} -Ionen können sowohl aus dem Extrazellulärraum als auch aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern ins Zytosol gelangen und somit die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Überladung verursachen.

1.4. Einstrom von Ca^{2+} -Ionen

Für den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen ist eine Vielzahl nichtselektiver Ca^{2+} -Kanäle (NCS) der Plasmamembran bekannt. Nilius und Droogmanns (2001) unterscheiden hier zwischen rezeptoraktivierten Kationenkanälen, amiloridsensitive NCS, Redox NCS und Kanälen, die durch zyklische Nukleotide geöffnet werden. In Endothelzellen sind rezeptoraktivierte Kationenkanäle in einer funktionellen Vielfalt zu finden. Die meisten

dieser Kanäle werden über eine Signalkaskade geöffnet, in der die Phospholipase C aktiviert wird. Allerdings ist in vielen Fällen unklar, welche sekundären Botenstoffe daran beteiligt sind. Amiloridsensitive NCS wurden in kleinen Gehirngefäßen und in Endothelzellen des Endokards gefunden. Sie sind permeabel für die monovalenten Kationen K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Na^+ , Li^+ und für Ca^{2+} und Ba^{2+} , nicht aber für Mg^{2+} und Mn^{2+} . Redox NCS, die durch Superoxidanionen nach oxidativem Stress aktiviert werden, sind für Na^+ , K^+ und Ca^{2+} in gleicher Weise permeabel. Durch zyklische Nukleotide zu öffnende NCS werden direkt durch cAMP oder cGMP geöffnet, aber auch durch Hyperpolarisation der Zellmembran. Sie sind permeabel für monovalente Kationen, aber auch für Ca^{2+} .

Des Weiteren sind an Endothelzellen verschiedene spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle beschrieben, die den T- und L-type- Ca^{2+} -Kanälen an endokrinen sekretorischen Zellen entsprechen (Bossu et. al., 1989 und 1992; Catterall et al., 1995; Vinet und Vargas, 1999). Da die T-type- Ca^{2+} -Kanäle am Ca^{2+} -Austausch nach Depolarisation der Zellmembran beteiligt sind, liegt eine Beteiligung an den Ca^{2+} -Signalen der Endothelzelle nahe. Ein weiterer spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanal, der R-type- Ca^{2+} -Kanal, scheint während der Aktivierung von Endothelzellen durch den platelet-activating factor (PAF) eine besondere Funktion zu haben. Zudem soll über diesen Kanal ein lang anhaltender Ca^{2+} -Einstrom stattfinden können (Bkaily et al., 1993). Bossu et al. (1992) fanden außerdem einen spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal mit einer geringen Leitfähigkeit in kapillaren Endothelzellen.

Neben nichtselektiven Ca^{2+} -Kanälen existieren an der Plasmamembran noch zwei weitere mögliche Mechanismen, die für den Ca^{2+} -Einstrom nach metabolischer Hemmung von Bedeutung sein können. Zum einen die Ca^{2+} -ATPase, die nach Aktivierung durch ATP Ca^{2+} aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum transportiert und deren Hemmung zu einem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg führt, und zum anderen der Na^+ / Ca^{2+} -Austauscher, durch den Ca^{2+} im Tausch mit Na^+ in das Zytosol oder aus dem Zytosol gelangt (Sedova und Blatter, 1999).

1.5 Das endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien als intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher

Die Ursache für die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Überladung in Endothelzellen unter metabolischer Hemmung kann aber auch in einem Entleeren von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern, wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER) oder den Mitochondrien, liegen.

1.5.1 Das endoplasmatische Retikulum

Das ER der Endothelzellen ist ein wichtiger intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher und an vielen zellulären Funktionen beteiligt (Strep et al., 1983; Berridge und Irvine, 1984; Exton, 1985; Carafoli, 1987). Es speichert nahezu 75 % der totalen intrazellulären Ca^{2+} -Reserve. Im Lumen des ER befinden sich zahlreiche Ca^{2+} -bindende Proteine wie Calsequestrin und Calreticulin (Koch, 1987; Booth und Koch, 1989). Diese Proteine besitzen eine große Ca^{2+} -Bindungskapazität, wobei jedes etwa 30 - 50 Ca^{2+} -Ionen binden kann. Daher kann die Ca^{2+} -Konzentration im ER bis zu 3 mM erreichen (Sambrook, 1990). Auf verschiedene humorale und mechanische Stimuli reagiert die Endothelzelle mit einer Ca^{2+} -Freisetzung. Da das ER das gesamte Zellzytoplasma durchzieht, ist stets ein unmittelbarer Kontakt zu Ca^{2+} -Signalen und Ca^{2+} -freisetzenden endogenen Faktoren gegeben, die in der Zelle gebildet werden. Somit bestimmt das ER zu einem großen Teil die Entstehung wichtiger Ca^{2+} -Signale, die in den meisten Vitalfunktionen der Zelle involviert sind. Die Ca^{2+} -ATPasen des ER und der Plasmamembran pumpen das Ca^{2+} aus dem Zytoplasma zurück in das ER oder in den Extrazellulärraum und sind damit wichtige Membranproteine für die Aufrechterhaltung der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Homöostase.

Am ER sind prinzipiell zwei Typen von Ca^{2+} -Kanälen vorhanden, über die Ca^{2+} ins Zytosol gelangt, die Inositoltrisphosphat- (Bezprozvanny, 2005) und die Ryanodinrezeptoren (Fill und Copello, 2002). Außer über diese Kanäle finden Ca^{2+} -Ionen mit Hilfe weiterer Mechanismen, die bisher nicht näher charakterisiert sind, den Weg aus dem ER ins Zytosol. Über diesen so genannten „Leckstrom“ werden Ca^{2+} -Ionen kontinuierlich ins Zytosol abgegeben. Möglicherweise sind unter pathophysiologischen Bedingungen auch die unten beschriebenen Inositoltrisphosphat-Rezeptoren oder Ryanodinrezeptoren für den „Leckstrom“

verantwortlich (Szulc et al., 2006). Dieser Verlust von Ca^{2+} wird durch die Ca^{2+} -ATPase des ER kompensiert.

Inositoltrisphosphat- und Ryanodinrezeptoren

Für die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER existieren zwei Freisetzungskanäle, die Inositoltrisphosphat-Rezeptoren (IP_3R) und die Ryanodinrezeptoren (RyR).

Über verschiedene Hormone und Wachstumsfaktoren, die an spezifische Rezeptoren der Plasmamembran koppeln, wird das Enzym Phospholipase C (PLC) aktiviert. PLC hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu den sekundären Botenstoffen Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol. IP_3 diffundiert von der Zellmembran zu den IP_3R der ER-Membran und öffnet so den Ca^{2+} -Kanal, wodurch Ca^{2+} ins Zytosol gelangt. IP_3R sind Multiproteinkomplexe, die aus vier Untereinheiten (jede ca. 300 kDa) bestehen (Bootman et al., 2001). Jede dieser Untereinheiten besteht aus einer IP_3 -Bindungsdomäne (Amino-Ende), einer Kanal-formenden Domäne (Carboxyl-Ende) und einer verbindenden Mittelstruktur (Bezprozvanny, 2005). Bislang sind drei verschiedene Gene bekannt, die für diese Untereinheiten kodieren. IP_3R existieren sowohl in homomerer als auch heteromerer Form (Taylor et al., 1999). Sie sind vor allem in nichterregbaren Zellen und in Endothelzellen zahlreich vertreten. Bisher wurden bei Säugetieren drei Isoformen charakterisiert (Typ 1, 2 und 3) (Furuichi et al., 1989; Yamada et al., 1994; Yamamoto-Hino et al., 1994), wovon die meisten Zellarten wenigstens eine Isoform besitzen, viele aber alle drei Typen exprimieren. Bislang sind die Strukturen, die für die Funktionen dieses Kanals verantwortlich sind, am besten bei den $\text{IP}_3\text{R1}$ untersucht (Bezprozvanny, 2005). Ohne das Vorhandensein von IP_3 ist die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER über die IP_3R nicht möglich. Allerdings wird die Aktivität der IP_3R über $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reguliert. So ist die Öffnungswahrscheinlichkeit der IP_3R gesteigert, wenn $[\text{Ca}^{2+}]_i$ moderat ansteigt (0,5 - 1 μM). Erreicht $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aber mehr als 1 μM wird die Öffnung der IP_3R gehemmt. Somit ist in vielen Zellen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ein entscheidender Faktor für die Entstehung von Ca^{2+} -Signalen. Weiterhin ist bekannt, dass eine erhöhte zytosolische IP_3 -Konzentration eine Ca^{2+} -induzierte Hemmung der IP_3R antagonisieren kann (Bootman und Lipp, 2000). Andere Faktoren, welche die Ca^{2+} -

Freisetzung via IP₃R limitieren, sind die rasche Hydrolyse von IP₃ und die intrinsische Desensitivierung der IP₃R (Oldershaw und Taylor, 1993).

RyR sind in Struktur und Funktionalität den IP₃R ähnlich. Sie haben jedoch ein nahezu doppelt so hohes Molekulargewicht und verfügen über die zweifache Leitfähigkeit der IP₃R. Auch die RyR besitzen eine gewisse Sensitivität in bezug auf [Ca²⁺]_i, nur dass sie, im Vergleich zu den IP₃R, bei höheren Konzentrationen aktiviert (1 - 10 µM), bzw. gehemmt werden (> 10 µM). Im Gegensatz zu IP₃R, die in nahezu allen Geweben vorkommen, sind RyR vor allem in erregbaren Zellen, wie Muskel- oder Nervenzellen, in großer Zahl vertreten. Auch bei den RyR werden die Untereinheiten von drei Genen kodiert. Die RyR-Typ 1 sind an der Verstärkung der Erregung von Skelettmuskelfasern beteiligt, RyR-Typ 2 dagegen übernehmen diese Funktion im Herzmuskel. In Skelettmuskeln werden auch RyR-Typ 3 beschrieben, die dort in niedriger Zahl vorkommen und deren Funktion noch untersucht wird (Tarroni et al., 1997). RyR verdanken ihren Namen der Tatsache, dass sie das pflanzliche Alkaloid Ryanodin mit hoher Affinität binden. In niedrigen Konzentrationen (1 - 10 µM) öffnet Ryanodin die RyR, während höhere Konzentrationen (1 - 10 mM) die Kanalöffnung irreversibel hemmen (Serysheva und Hamilton, 1998; Fill und Copello, 2002). Die RyR sind bisher vor allem in Skelett- und Herzmuskelzellen sehr gründlich untersucht worden. Daneben gibt es Hinweise darauf, dass RyR auch in aortalen und endokardialen Endothelzellen des Schweins vorkommen könnten (Lesh et al., 1993). Ziegelstein et al. (1994) postulieren funktionale Ryanodin-sensitive Ca²⁺-Speicher in vaskulären Endothelzellen. Ein direkter eindeutiger Nachweis von funktionellen RyR in Endothelzellen steht noch aus.

1.5.2 Die Mitochondrien

Die Mitochondrien sind die zweiten wichtigen intrazellulären Ca²⁺-Speicher in Endothelzellen. Sie enthalten etwa 25 % der zellulären Ca²⁺-Reserve. Früher wurden Mitochondrien einfach als Ca²⁺-Speicher mit hoher Kapazität und niedriger Affinität betrachtet, die nur im Falle einer [Ca²⁺]_i-Überladung der Zelle die Menge Ca²⁺ aufnehmen, die sonst das ER überlasten würde (Gunter und Pfeiffer, 1990). Die mitochondriale Ca²⁺-Freisetzung folgt dem Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER (Tran et al., 2000). Auffallend erscheint die enge Assoziation der Mitochondrien mit Regionen des ER, die reich an IP₃R sind. Die Kommunikation zwischen Ca²⁺-Signalen

mitochondrialen Ursprungs und denen aus dem ER scheint in der Kontrolle der $[Ca^{2+}]_i$ der Zelle sowohl im Basalzustand als auch in stimulierten Situationen eine wichtige Rolle zu spielen (Csordas et al., 1999).

1.6 Store-operated calcium entry

Unter metabolischer Hemmung der Endothelzellen werden zwei Phasen des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs beobachtet. Verschiedene Autoren beschreiben das Phänomen als einen Ca^{2+} -getriggerten Ca^{2+} -Einstrom, den so genannten „store-operated calcium entry (SOC)“. Damit ist gemeint, dass der Phase 1- $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg seine Ursache in einem Entleeren eines intrazellulären Ca^{2+} -Speichers hat. Diese Ca^{2+} -Entladung triggert einen Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran, der den Phase 2- $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg zur Folge hat (Schilling et al., 1992; Vaca und Kunze, 1994).

Die Mechanismen, die sich hinter dem SOC verbergen, waren lange Zeit nur teilweise verstanden. Nach Taylor (2006) sind die zwei Proteine STIM1 und Orai1 funktionell am Mechanismus des SOC beteiligt. STIM1, ein integrales Membranprotein des ER, bildet dabei den Ca^{2+} -Sensor, der den Verlust von Ca^{2+} im ER registriert. Es kommuniziert daraufhin mit Orai1, einem Protein an der Zellmembran, das einen Ca^{2+} -Einstromkanal bildet. Ong et al. (2007) beschreiben, dass zusätzlich zu STIM1 und Orai1 der TRP1-Kanal erforderlich ist. Der genaue Mechanismus hinter der Entstehung des Ca^{2+} -Einstromkanals ist noch nicht eindeutig geklärt.

1.7 Ziel der Arbeit

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen zu analysieren, die in metabolisch gehemmten Endothelzellen zu einem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg führen und infolge dessen es zu Störungen in der Schrankenfunktion der Endothelzellschicht kommt. Dazu wurden folgende Fragen untersucht:

1. Wie wirken sich die Hemmung der Glykolyse mit 2-Desoxyglukose (2-DG) und die Hemmung der mitochondrialen Atmung mit Natriumcyanid (NaCN) auf $[Ca^{2+}]_i$ aus und sind in der Endothelzellschicht mikroskopisch sichtbare Veränderungen erkennbar?
2. Wie wirkt sich die Hemmung der Glykolyse auf den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg aus, wenn die Endothelzellen in Gegenwart von Pyruvat, als Substrat der mitochondrialen Atmung, vorinkubiert werden? Wie verhält sich $[Ca^{2+}]_i$, wenn Endothelzellen in Gegenwart von Glukose, als Substrat für die Glykolyse, vorinkubiert werden und dann die mitochondriale Energieproduktion gehemmt wird?
3. Wie verhält sich die zytosolische ATP-Konzentration während des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs nach metabolischer Hemmung?
4. Sind die Ergebnisse der Experimente mit kultivierten Endothelzellen auf Endothelzellen auf frischen Aortensegmenten übertragbar?
5. Findet im Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ -Überladung ein Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum statt?
6. Welche Wirkung hat die Hemmung der ER- Ca^{2+} -ATPase auf $[Ca^{2+}]_i$ nach Zugabe von 2-DG?
7. Welche Wirkung hat die Hemmung der IP₃R und der RyR am ER auf den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg unter metabolischer Hemmung?
8. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der $[Ca^{2+}]_i$ -Überladung und der interendothelialen Lückenbildung in metabolisch gehemmten Endothelzellen?

Die Versuche wurden an kultivierten, passagierten Endothelzellen (Passage 1) aus der Schweineaorta durchgeführt. Um den Mechanismus der Ca^{2+} -Freisetzung in einem möglichst *in-vivo*-nahen Modell zu überprüfen, wurden Untersuchungen zur $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Homöostase auch an Endothelzellen *in-situ* auf intakten Aortensegmenten durchgeführt. Änderungen in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und die Bildung interendothelialer Lücken wurden in den verschiedenen experimentellen Modellen mittels der Fura 2-Methode mit einem Video-Imaging-System kontinuierlich analysiert.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien waren von höchster verfügbarer Qualität und wurden gemäß Herstellerangaben gelöst und gelagert.

ATP	Boehringer, Mannheim
Cyclopiazonsäure (CPA)	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
2-Desoxy-D-Glukose (2-DG)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
EDTA-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
EGTA-Natriumsalz	Boehringer, Mannheim
FKS (fötales Kälberserum)	PAA Labarotories, Cölbe
Fura 2 AM	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Glukose	Merck, Darmstadt
HEPES	Boehringer, Mannheim
Ionomycin	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
MnCl ₂	Merck, Darmstadt
Medium 199 / Earles Salz	Gibco BRL, Eggenstein
Natriumcyanid (NaCN)	Merck, Darmstadt
NKS (Neugeborenen Kälberserum)	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin / Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Pyruvat	Boehringer, Mannheim
Ryanodin	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Thapsigargin (THG)	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Eggenstein
Xestospongine C (XeC)	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden

Alle weiteren Chemikalien wurden in der höchst erhältlichen Qualität von den Firmen Boehringer (Mannheim), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haen (Seelze) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.2 Puffer und Kulturmedien

Primärmedium:

M 199 mit Earles Salz,
20 % (v / v) NKS,
250 IU / ml Penicillin,
250 µg / ml Streptomycin

Kulturmedium:

M 199 mit Earles Salz,
20 % (v / v) NKS,
100 IU / ml Penicillin,
100 µg / ml Streptomycin

HEPES-Puffer (pH 7,4; sterilfiltriert):

125 mM NaCl,
2,6 mM KCl,
1,2 mM MgCl₂,
1,2 mM KH₂PO₄,
25 mM HEPES,
1 mM CaCl₂

Calciumfreier HEPES-EDTA-Puffer (pH 7,4; sterilfiltriert):

125 mM NaCl,
2,6 mM KCl,
1,2 mM MgCl₂,
1,2 mM KH₂PO₄,
25 mM HEPES,
1 mM EDTA

Beladungsmedium:

M 199 mit Earles Salz,
5 % (v / v) NKS,
2,5 μ M Fura 2 AM, bzw. 5 μ M Fura 2 AM,
< 0,1 % (v / v) DMSO

Inkubationsmedium:

HEPES-Puffer (s.o.),
2 % (v / v) NKS

2.3 Isolierung und Kultivierung makrovaskulärer Endothelzellen aus der Schweineaorta

Endothelzellen wurden nach Spahr und Piper (1990) aus der Schweineaorta isoliert und kultiviert. Auf dem Schlachthof wurden aus dem Geschlinge von etwa sechs Monate alten Schlachtschweinen 20 cm bis 25 cm lange Aortensegmente vom Aortenbogen bis zum Zwerchfell entnommen. Die Segmente wurden aus dem umgebenden Bindegewebe freipräpariert, in Längsrichtung entlang den Gefäßabgängen der Interkostalarterien aufgeschnitten und auf einer Unterlage aufgespannt. Unter sanftem Druck wurden die Endothelzellen mit einer Skalpellklinge abgeschabt und in Medium 199 überführt. Darin wurden die Endothelzellen für 10 min bei 150 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden sie im Primärmedium resuspendiert und mit einer Dichte von 10^6 Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen (Primaria®, Falcon) ausplattiert. Die Kulturschalen wurden danach im Brutschrank in Gegenwart von 5 % (vol / vol) CO₂ bei einer Temperatur von 37° C für zunächst drei Stunden inkubiert. Dann wurde das Primärmedium gewechselt, um die nicht am Boden haftenden Endothelzellen zu entfernen. Nach zwei Tagen wurde das Primärmedium gegen das Kulturmedium ausgetauscht.

Fünf bis sieben Tagen später waren auf den Böden der Kulturschalen konfluente Endothelzellschichten gewachsen. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Kulturen zweimal mit HEPES-EDTA-Puffer gewaschen. Zum Ablösen wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung bei 37° C im CO₂-freien Brutschrank inkubiert. Die Trypsinisierung der Zellen wurde nach fünf Minuten durch Zugabe von 20 ml

Kulturmedium gestoppt. Anschließend wurden die Endothelzellen mit einer Dichte von 7×10^4 Zellen / cm^2 auf Glasplättchen (Durchmesser 25 mm) ausgesät. Vier Tage nach Aussaat hatte sich ein konfluenten Zellmonolayer gebildet. Mit diesen Endothelzellen wurden über die folgenden drei Tage die Experimente durchgeführt. Für *in-situ*-Versuche mit frischen Endothelzellen auf der Aorta wurden Segmente mit einem Durchmesser von 8 mm aus der Schweineaorta gestanzt und unmittelbar in Experimenten eingesetzt.

2.4 Bestimmung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde mit Hilfe des Ca^{2+} -Indikators Fura 2 fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Auf runden Glasplättchen (Durchmesser 25 mm) kultivierte Endothelzellen wurden für 45 Minuten - Aortensegmente für *in-situ* Versuche für 60 Minuten - bei 20°C in Dunkelheit in Medium 199 plus 5 % (vol / vol) NKS (hitzeinaktiviert) inkubiert und mit $2,5 \mu\text{M}$ Fura 2 AM (zellpermeabler Fura 2-Acetoxymethylester) beladen (Beladungsmedium). In einem anschließenden Medienwechsel wurde das extrazelluläre Fura 2 AM entfernt und Inkubationsmedium zu den Zellen gegeben. Die Glasplättchen wurden dann in eine temperaturkontrollierte Kammer auf dem Fluoreszenzmikroskop (IX 70, Olympus; Hamburg, Deutschland) - ebenfalls in Inkubationsmedium - eingesetzt. Um die Hydrolyse von Fura 2 zu gewährleisten, wurden die Endothelzellen vor Beginn der Messungen für 20 Minuten bei 35°C inkubiert. Für die Experimente mit Endothelzellen auf Aortensegmenten war die Inkubationszeit 60 Minuten und die Fura 2-Konzentration $5 \mu\text{M}$.

Die Analyse von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde mit dem „TILL Photonic Imaging-System“ (Martinsried, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden die Endothelzellen alternierend mit Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm angeregt (Bandbreite 2 nm). Die Belichtungszeit betrug jeweils 30 ms. Das bei 510 nm (Bandbreite 5 nm) emittierte Licht wurde von einer CCD-Kamera als digitales Bildpaar in Intervallen von sechs Sekunden aufgenommen und auf einem Computer gespeichert. Bei der Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität über eine Minute gemittelt und um den Einfluss der Hintergrundfluoreszenz korrigiert.

Die Kalibrierung der Fura 2-Fluoreszenz wurde in Anlehnung an die Methode von Grynkiewicz et al. (1985) durchgeführt. Zur Bestimmung des Fluoreszenzmaximums

(R_{\max}) wurden die Endothelzellen in einer HEPES-Lösung mit 3 mM Ca^{2+} und 5 μM Ionomycin, einem Ca^{2+} -Ionophor, inkubiert. Das Minimum (R_{\min}) der Fluoreszenz wurde nach Inkubation der Zellen in HEPES plus 5 mM EGTA und 5 μM Ionomycin ermittelt. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times \beta \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

(K_d) ist die Dissoziationskonstante von Fura 2 und β das Verhältnis (Ratio) des Exzitationssignals ionomycinbehandelter Zellen bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 380 nm in Gegenwart von 3 mM Ca^{2+} oder 5 mM EGTA (Li et al., 1987). Die Kalibrierung des Fluoreszenzsignals wurde mit Proben jeder Kulturpräparation durchgeführt. In Endothelzellen auf Aortensegmenten wurden Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ebenfalls mit dem „TILL Photonic Imaging-System“ analysiert, das mit dem Fluoreszenz-Mikroskop (BX WI, Olympus; Hamburg, Deutschland) verbunden war. Der Fokus des Mikroskops war auf die Endothelzellschicht eingestellt. Die Werte wurden als Ratio der Fura 2-Fluoreszenz dargestellt.

2.5 Messung der interendothelialen Lückenbildung

Die Bildung der interendothelialen Lücken nach Energieverarmung wurde bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 360 nm bestimmt. Bei einer Anregung von 360 nm ist die Fura 2-Fluoreszenz unabhängig von $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die Bilder wurden im Abstand von sechs Sekunden aufgenommen und automatisch binärisiert. Die fluoreszierenden Bereiche bekamen den Wert 1 und Bereiche, in denen keine Zellen waren und nicht fluoreszierten, wurden auf den Wert 0 gesetzt. Anschließend wurden die auf 0 gesetzten Bildpunkte integriert. In der Regel enthielten Kontrollbilder zu Beginn der metabolischen Hemmung 8.000 – 12.000 Bildpunkte mit dem Wert 0. Diese Anzahl an *0-Bildpunkten* zu Beginn des Experiments wurde gleich 100 % gesetzt.

2.6 Bestimmung des Ca^{2+} -Einstroms

Die Eigenschaft, dass Mn^{2+} -Ionen das Fluoreszenzsignal von Fura 2 *löschen* können, wurde genutzt, um den Einstrom von Ca^{2+} als zweiwertiges Kation über die endotheliale Plasmamembran zu bestimmen (Trepakova et al., 1999). Dazu wurden Fura 2-beladene Endothelzellen mit Licht der Wellenlänge 360 nm angeregt und die Emission bei 510 nm fortlaufend gemessen. Dabei wurde gleichzeitig dieses Signal um die Hintergrundfluoreszenz, gemessen an einem zellfreien Bezirk, korrigiert. Die Experimente wurden mit Endothelzellen in Inkubationsmedium plus 1 mM Ca^{2+} durchgeführt, dem zu Beginn des Experiments 100 μM MnCl_2 zugegeben wurde.

2.7 Zellulärer ATP-Gehalt

Der zelluläre ATP-Gehalt wurde nach der Methode von Jüngling und Kammermeier (1980) mit der High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) bestimmt. Endothelzellen wurden dafür über einen Zeitraum von 45 Minuten im Beladungsmedium bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie, wie die Endothelzellen für die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen, in Inkubationsmedium überführt und dort für 20 Minuten bei 35°C belassen. Danach wurde das Inkubationsmedium entfernt und zu den Endothelzellen wurden 300 μl 0,6 M Perchloressigsäure (PCA) mit einer Temperatur von 4°C gegeben. Die Endothelzellen wurden in Eppendorfgefäße überführt und über eine Minute bei 13.000 g zentrifugiert.

Das Sediment wurde für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) verwendet. Dazu wurden die durch die PCA gefällten Proteine der Endothelzellen in 2 ml 1 N NaOH plus 0,01 % (w / v) Sodiumdodezylsulfat (SDS) bei 37°C gelöst und anschließend 5 μl der Lösung zu 200 μl „Bradford-Reagenz“ (0,01 % (w / v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 5 % (v / v) Ethanol und 10 % (v / v) Phosphorsäure (85 %ig)) gemischt. Die Extinktion der Proteine wurde in einem ELISA-Reader bei 595 nm bestimmt. Als Referenzlösung diente bovines Serumalbumin einer definierten Proteinkonzentration.

Der Überstand wurde mit 2 M K_2CO_3 -Lösung neutralisiert und über 1,5 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Mittels HPLC wurde der Überstand auf den ATP-Gehalt analysiert. Die ATP-Konzentration wurde in nmol ATP / mg zelluläres Protein angegeben und in Relation zu den ATP-Gehalten in unbehandelten Kontrollzellen gesetzt.

2.8 Experimentelle Protokolle

Die Endothelzellen wurden zur Bestimmung von $[Ca^{2+}]_i$ und des zytosolischen ATP-Gehalts in der Inkubationsphase und während der Experimente in gleicher Weise behandelt. Um die glykolytische oder die mitochondriale Energieproduktion der Endothelzellen zu hemmen, wurde dem Beladungsmedium 2-Desoxyglukose (2-DG; 2,5 - 10 mM) oder Natriumcyanid (NaCN; 1 - 5 mM) zugegeben. In einigen Experimenten mit 2-DG wurde Pyruvat (5 mM) eingesetzt und in einem Teil der NaCN-Experimente Glukose (10 mM). Andere Substanzen wurden je nach Fragestellung verwendet. Stammlösungen für Cyclopiazonsäure, Ionomycin, Thapsigargin und Xestospongin C wurden mit Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Es wurden angemessene Volumina für die Stammlösungen eingesetzt, so dass die Endkonzentration von 0,1 % (vol / vol) DMSO nicht überschritten wurde. Dieselbe DMSO-Konzentration wurde auch in allen Kontrollexperimenten eingesetzt. Die Stammlösungen für alle anderen Substanzen wurden mit HEPES-Puffer hergestellt. Auch hier wurden entsprechende Volumina für die Versuche und für die Kontrollexperimente verwendet.

2.9 Statistische Analyse

Dargestellt sind der Mittelwert \pm SE von mindestens 50 Zellen aus drei Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. Die statistische Auswertung wurde mittels One-Way ANOVA in Verbindung mit dem Student-Newman-Keuls-Test für die post hoc Analyse durchgeführt. Bei dem Gruppenvergleich wurden P-Werte $< 0,05$ als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Endothelzellen reagieren auf die simultane Zugabe von Natriumcyanid und 2-Desoxyglukose mit Änderungen in der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und der Bildung interendothelialer Lücken

Die zeitgleiche Zugabe von 5 mM NaCN und 10 mM 2-DG rief in kultivierten aortalen Endothelzellen des Schweins einen biphasischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg hervor (Abb. 3.1). NaCN ist ein Hemmstoff der mitochondrialen Atemkette. Es blockiert die Cytochrom c Oxidase und verhindert damit den Elektronenfluss, der für die ATP-Synthese essentiell ist (Nicolls, 1982; Wilson et al., 1994). 2-DG wird - wie Glukose auch - phosphoryliert und in 2-Desoxyglukose-6-Phosphat umgewandelt. Die weiteren Schritte der Glykolyse werden aber nicht durchlaufen, so dass 2-Desoxyglukose-6-Phosphat in der Zelle akkumuliert und damit die Glykolyse sowie deren ATP-Synthese hemmt (Sokoloff et al., 1977).

Das Maximum des Phase 1-Anstiegs war etwa eine Minute nach Zugabe der Hemmstoffe erreicht. Anschließend nahm $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zunächst wieder ab und stieg danach über den gesamten Beobachtungszeitraum progressiv wieder an (Phase 2). Zeitgleich mit der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Überladung traten zwischen den Endothelzellen Lücken auf. Diese interendothelialen Lücken blieben über die gesamte Versuchsdauer bestehen.

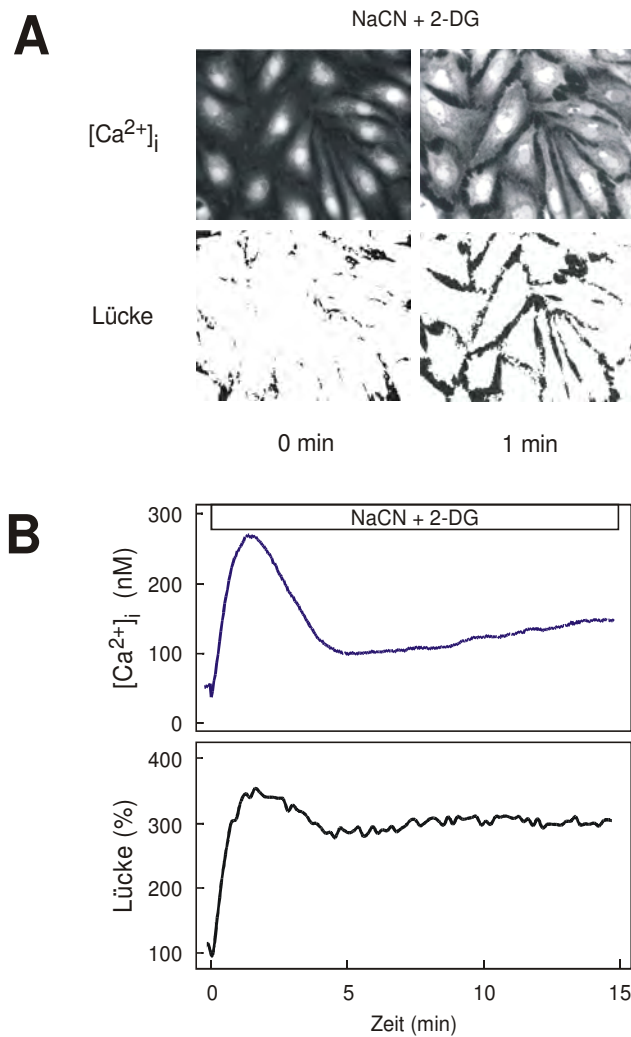


Abbildung 3.1:

Wirkung von NaCN und 2-DG auf $[Ca^{2+}]_i$ und Bildung interendothelialer Lücken.

(A) Fura 2-beladene aortale Endothelzellen zum Zeitpunkt 0 und 1 min nach Zugabe von 5 mM NaCN + 10 mM 2-DG. *Oben:* Original Video-Imaging-Aufnahmen. Bereits 1 min nach Zugabe der Hemmstoffe war der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch die verstärkte Fluoreszenz deutlich erkennbar. *Unten:* Original Video-Imaging-Aufnahmen nach deren Binärisierung. Zeitgleich mit dem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg entstanden interendotheliale Lücken. (B) Zeitlicher Verlauf des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs und Lückenbildung. Der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg zeigte einen biphasischen Verlauf. Die simultan mit dem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg entstandenen interendothelialen Lücken dagegen blieben über den Versuchszeitraum erhalten.

3.2 Wirkung von 2-Desoxyglukose auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration

Auch die alleinige Zugabe von 2-DG löste in Endothelzellen einen biphasischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg aus (Abb. 3.2). Das Ausmaß der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Überladung war dabei von der 2-DG-Konzentration abhängig. Bis 10 mM 2-DG stieg $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konzentrationsabhängig an. Höhere 2-DG-Konzentrationen bewirkten keine weitere $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Zunahme. Alle folgenden Experimente dieser Arbeit wurden daher mit 10 mM 2-DG durchgeführt.

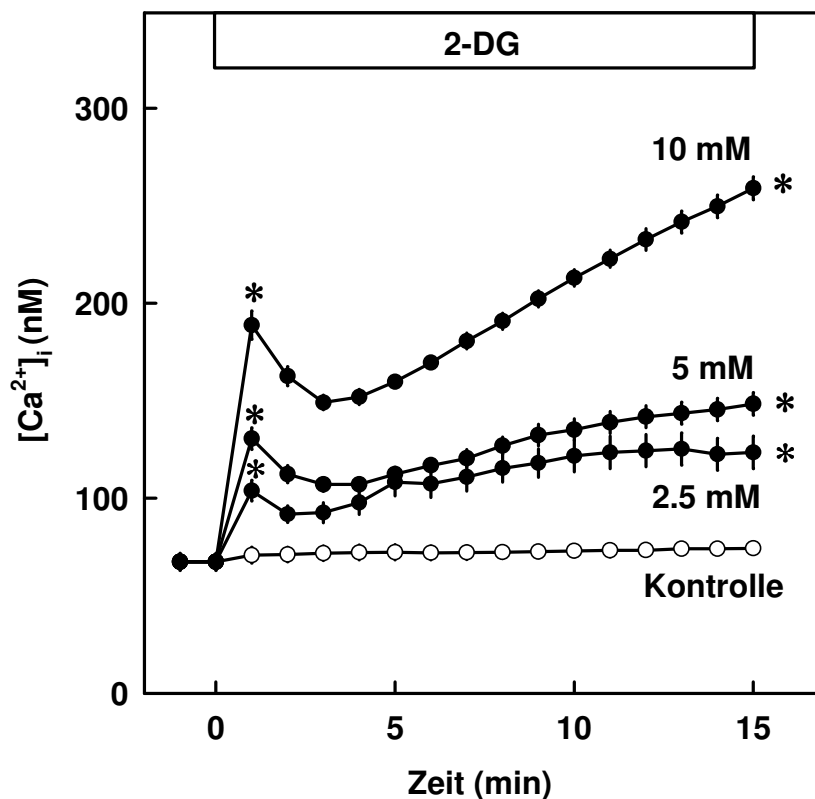


Abbildung 3.2:

Konzentrationsabhängige Wirkung von 2-DG auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aortaler Endothelzellen.

(●) Endothelzellen wurden in Gegenwart von 2,5, 5 und 10 mM 2-DG inkubiert.
(○) Kontrollversuche wurden in substratfreiem Medium durchgeführt. Die Zugabe von 2-DG induzierte einen konzentrationsabhängigen biphasischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE von 60 Zellen. *P < 0,05 vs. Kontrolle.

3.3 Einfluss von Pyruvat auf den 2-Desoxyglukose-induzierten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration

Um die Wirkung von Pyruvat als Substrat der mitochondrialen Energieproduktion auf die metabolische Hemmung durch 2-DG zu testen, wurden die Endothelzellen vor Versuchsbeginn 20 Minuten lang in Gegenwart von 5 mM Pyruvat inkubiert. Wie Abb. 3.3 zeigt, war in Gegenwart von Pyruvat die initiale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Zunahme (Phase 1) gesteigert und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Phase 2 im Vergleich zu den nicht vorinkubierten Kontrollen reduziert. Wesentlich ist hier, dass im Gegensatz zu den Experimenten mit NaCN plus Glukose (Abb. 3.5) sich der biphasische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg deutlich darstellte.

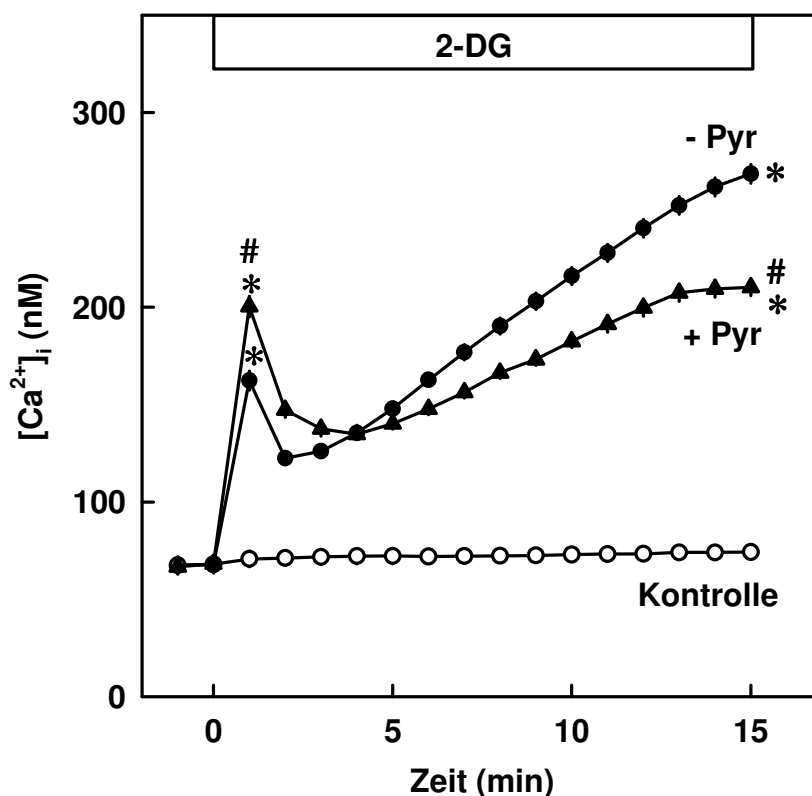


Abbildung 3.3:

Wirkung von Pyruvat (Pyr) auf den 2-DG-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg.

Endothelzellen wurden für 20 min in Gegenwart (▲) oder Abwesenheit (●) von 5 mM Pyruvat inkubiert. Anschließend wurden 10 mM 2-DG zugegeben. Durch die Vorinkubation mit Pyruvat war die initiale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Zunahme gesteigert. Der Phase 2- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg war im Vergleich zu den Kontrollversuchen (○) ohne 2-DG in substratfreiem Medium reduziert. Pyruvat allein hatte keinen Einfluss auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Daten nicht abgebildet). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE von $n = 60$ Zellen. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle ohne 2-DG und ohne Pyruvat; # $P < 0,05$ vs. 2-DG allein.

3.4 Wirkung von Natriumcyanid auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration

Wurde NaCN allein zu Endothelzellen gegeben, war ebenfalls ein konzentrationsabhängiger biphasischer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg zu beobachten (Abb. 3.4). In einem Konzentrationsbereich von 1 bis 5 mM NaCN konnte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gesteigert werden. Höhere NaCN-Konzentrationen führten zu keinem weiteren $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg. Daher wurde in allen folgenden Experimenten dieser Arbeit NaCN in der Konzentration 5 mM eingesetzt. Im Vergleich zur 2-DG-Wirkung war das Maximum des NaCN-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs signifikant kleiner.

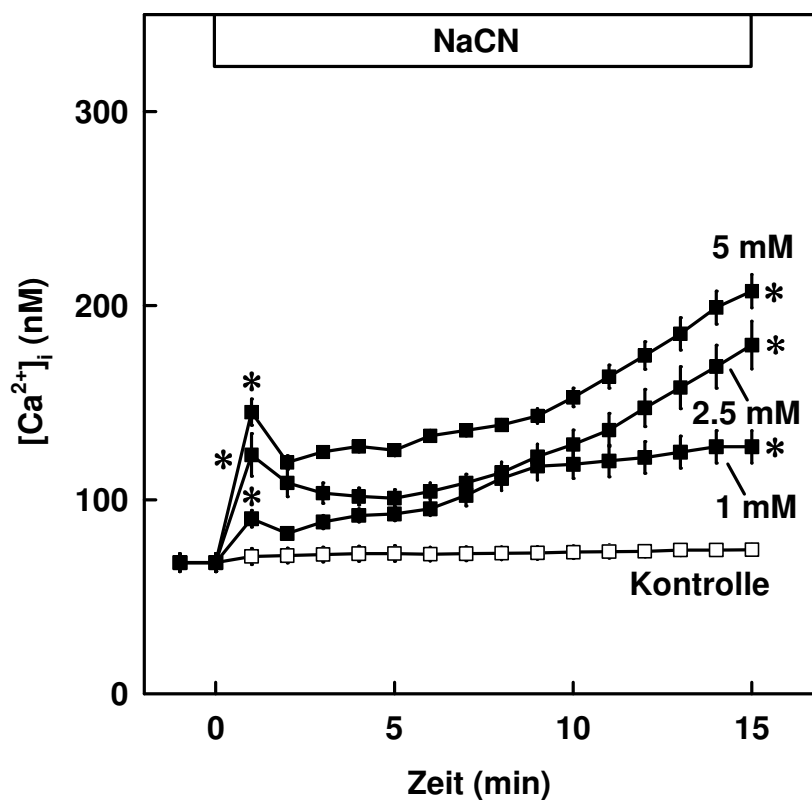


Abbildung 3.4:

Konzentrationsabhängige Wirkung von NaCN auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aortaler Endothelzellen.

(■) Endothelzellen wurden in Gegenwart von 1, 2,5 und 5 mM NaCN inkubiert. (□) Kontrollversuche wurden in substratfreiem Medium durchgeführt. Die Zugabe von NaCN induzierte einen konzentrationsabhängigen biphasischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE von $n = 60$ Zellen. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle.

3.5 Einfluss von Glukose auf den Natriumcyanid-induzierten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration

Anschließend wurde der Einfluss von Glukose als Substrat der Glykolyse auf den NaCN-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg untersucht. Dazu wurden Endothelzellen in Gegenwart von 10 mM Glukose über 20 Minuten inkubiert und dann 5 mM NaCN zugegeben. Abb. 3.5 zeigt, dass in Gegenwart von Glukose der Phase 1- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg nahezu aufgehoben und der Phase 2-Anstieg deutlich reduziert war.

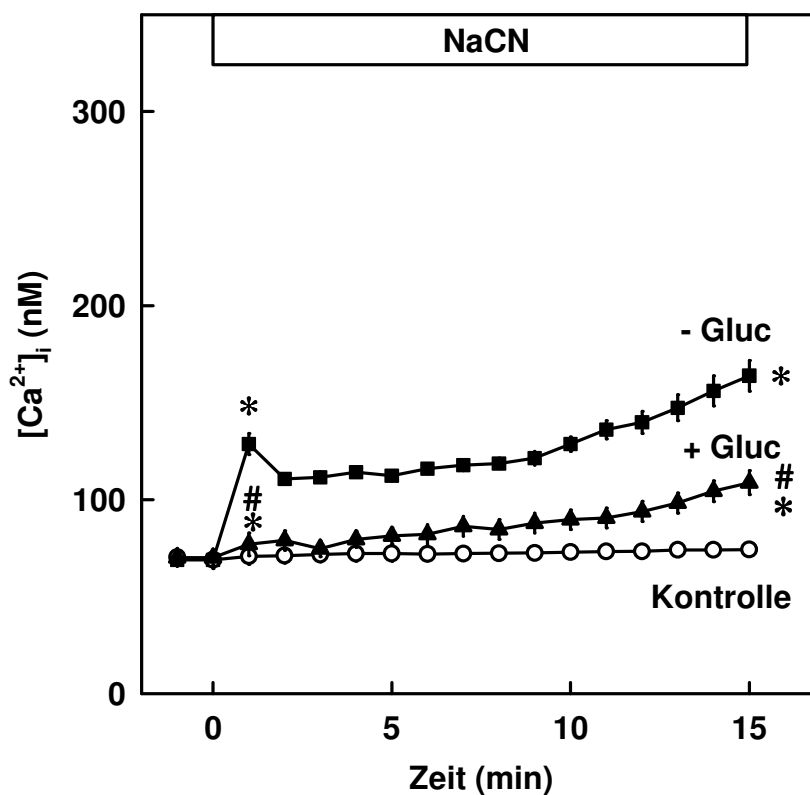


Abbildung 3.5:

Wirkung von Glukose (Gluc) auf den NaCN-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg.

Endothelzellen wurden für 20 min in Gegenwart (▲) oder Abwesenheit (■) von 10 mM Glukose inkubiert. Anschließend wurden 5 mM NaCN zugegeben. Die Vorinkubation mit Glukose hob die NaCN-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Überladung nahezu auf. Kontrollversuche (○) wurden ohne NaCN in substratfreiem Medium durchgeführt. Glukose allein hatte keinen Einfluss auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Daten nicht aufgeführt). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE von $n = 60$ Zellen. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle ohne NaCN und ohne Glukose; # $P < 0,05$ vs. NaCN allein.

3.6 Metabolische Hemmung von Endothelzellen auf Aortensegmenten

Die oben beschriebenen Experimente wurden auch mit frischen Endothelzellen auf Aortensegmenten durchgeführt, um deren Reaktionen unter *in-vivo*-nahen Bedingungen zu beobachten (Abb. 3.6). Die Endothelzellen der Aortensegmente zeigten unter metabolischer Hemmung das gleiche Verhalten wie kultivierte Endothelzellen. Analog zu den Endothelzellen in Kultur löste die Zugabe von 2-DG oder NaCN einen biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg aus. Wurden die Zellen auf den Aortensegmenten in Gegenwart von Pyruvat vorinkubiert, war der 2-DG-induzierte Phase 1- $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg höher und die Phase 2 deutlich erkennbar. Dagegen führte die Vorbehandlung mit Glukose dazu, dass der NaCN-induzierte Phase 1- $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg nahezu aufgehoben und der Phase 2-Anstieg reduziert war.

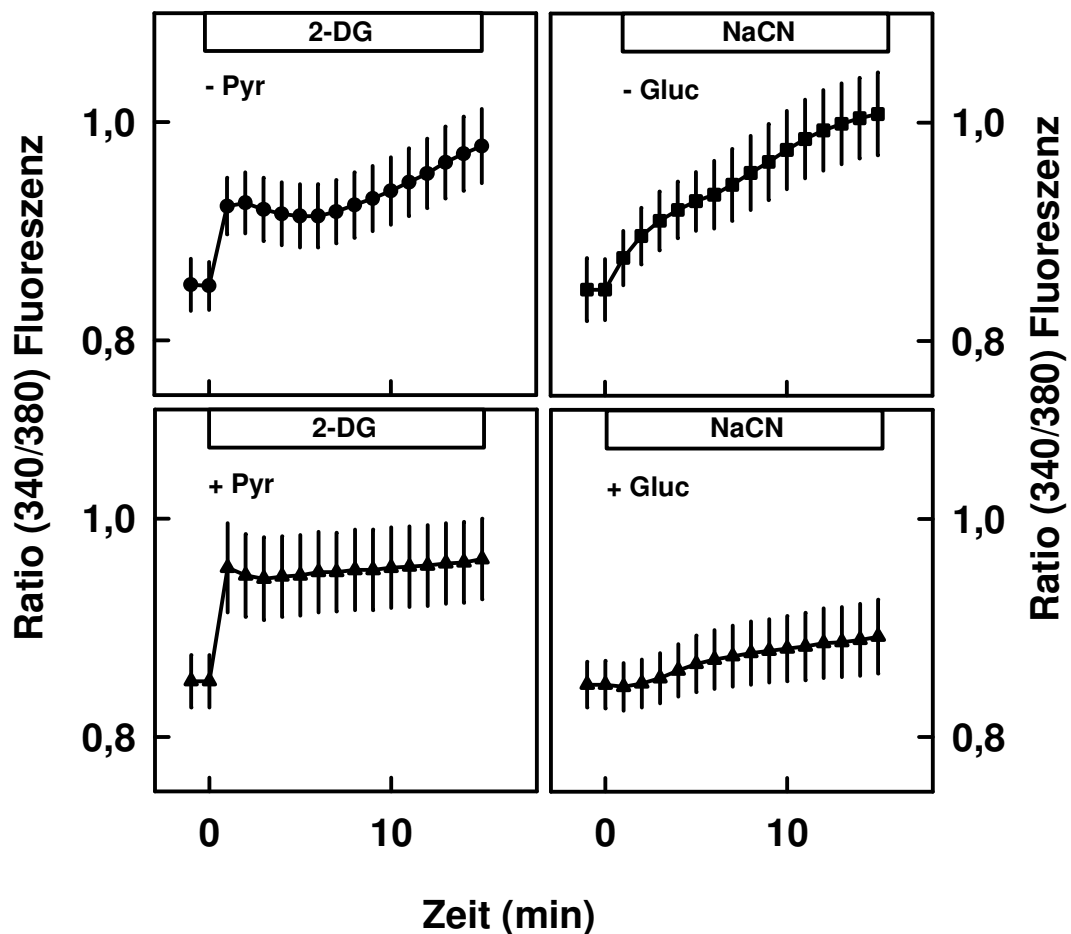


Abbildung 3.6:

Wirkung der metabolischen Hemmung auf frische Endothelzellen auf Aortensegmenten.

Links: Einfluss von Pyruvat auf den 2-DG-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Endothelzellen wurden für 20 min ohne Pyruvat (- Pyr, ●) oder in Gegenwart von 5 mM Pyruvat (+ Pyr, ▲) inkubiert. Anschließend wurden 10 mM 2-DG zugegeben. *Rechts:* Einfluss von Glukose auf den NaCN-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Endothelzellen wurden für 20 min ohne Glukose (- Gluc, ■) oder in Gegenwart von 10 mM Glukose (+ Gluc, ▲) inkubiert. Anschließend wurden 5 mM NaCN zugegeben. Frische Endothelzellen auf isolierten Aortensegmenten reagierten auf die metabolischen Hemmstoffe ganz analog zu kultivierten Zellen mit einem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Angegeben ist das Verhältnis (Ratio) der Fura 2-Fluoreszenz bei einer Anregung von 340 nm / 380 nm. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE von n = 60 Zellen.

3.7 Änderungen der zytosolischen ATP-Konzentration in metabolisch gehemmten Endothelzellen

In einer nächsten Versuchsreihe wurde die zytosolische ATP-Konzentration nach metabolischer Hemmung der Endothelzellen bestimmt. Das Ergebnis zeigt, dass zu dem Zeitpunkt des maximalen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs, also etwa eine Minute nach Zugabe von 10 mM 2-DG (Abb. 3.7) oder 5 mM NaCN (Abb. 3.8), die zytosolische ATP-Konzentration nur geringfügig abgenommen hatte. Eine Inkubation der Zellen für 20 Minuten in Gegenwart von 5 mM Pyruvat oder von 10 mM Glukose vor Zugabe der Hemmstoffe 2-DG bzw. NaCN hatte keinen Einfluss auf die zytosolische ATP-Konzentration.

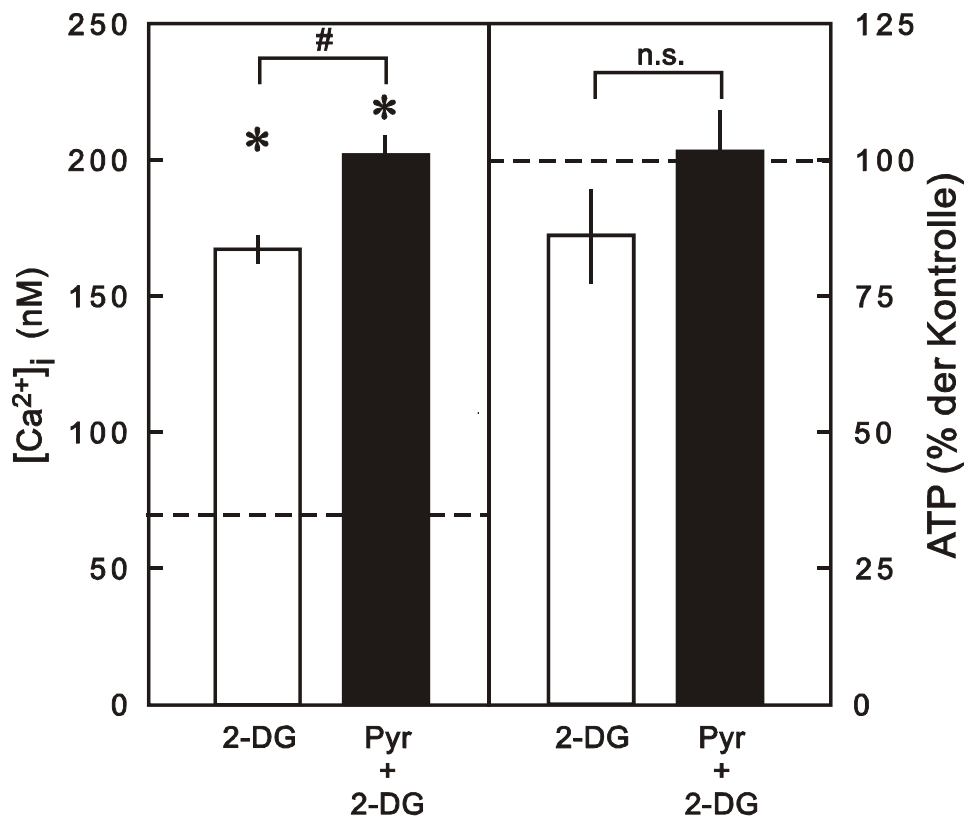


Abbildung 3.7:

Wirkung von 2-DG in Gegenwart oder in Abwesenheit von Pyruvat (Pyr) auf den endothelialen ATP-Gehalt und $[Ca^{2+}]_i$.

Endothelzellen wurden für 20 min in Gegenwart oder Abwesenheit von 5 mM Pyruvat inkubiert. Anschließend wurden 10 mM 2-DG zugegeben. Angegeben ist der Wert 1 min nach Zugabe von 2-DG. Kontrollversuche wurden in Abwesenheit von 2-DG und Pyruvat durchgeführt (unterbrochene Linien). *Links:* Die Zugabe von Pyruvat reduzierte nicht die 2-DG-induzierte Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$. *Rechts:* Nach Zugabe von 2-DG allein ist die zytosolische ATP-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle geringfügig niedriger. In den Experimenten mit 2-DG + Pyruvat ist die ATP-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle unverändert. 100 % ATP entspricht einem ATP-Gehalt von $17,6 \pm 1,1$ nmol / mg Protein (n = 18). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE von n = 6 Zellkulturen aus drei unabhängigen Zellpräparationen. *P < 0,05 vs. Kontrolle; #P < 0,05; n.s., nicht signifikant verschieden.

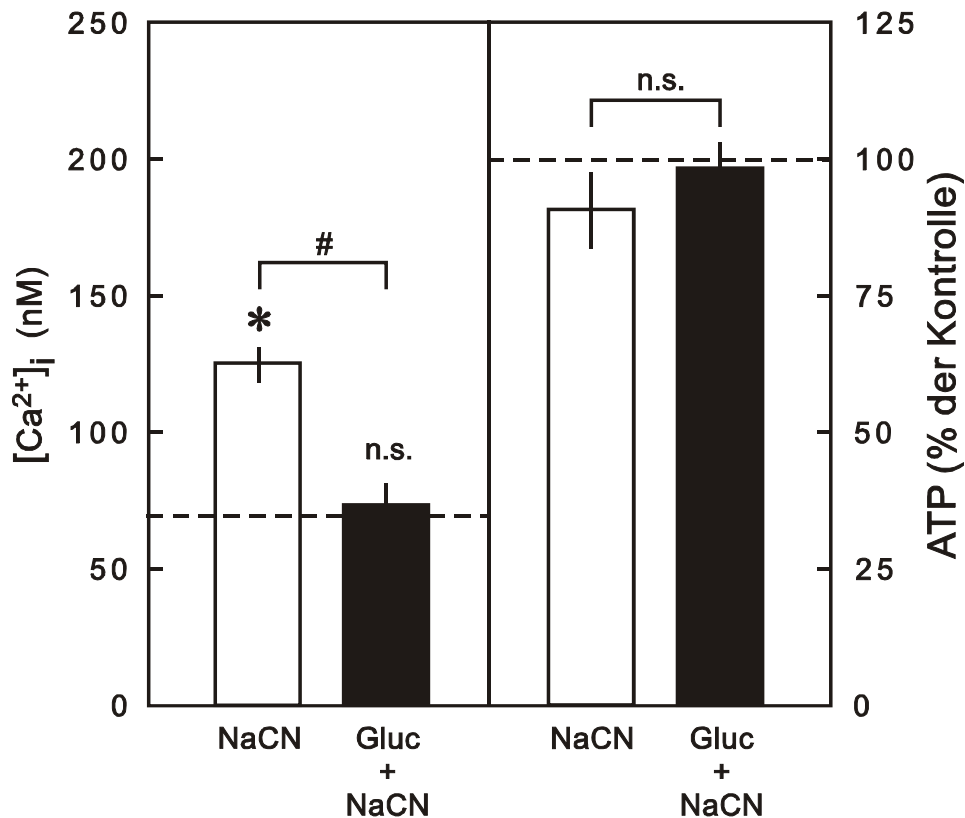


Abbildung 3.8:

Wirkung von NaCN in Gegenwart oder in Abwesenheit von Glukose (Gluc) auf den endothelialen ATP-Gehalt und $[Ca^{2+}]_i$.

Endothelzellen wurden für 20 min in Gegenwart oder Abwesenheit von 10 mM Glukose inkubiert. Anschließend wurden 5 mM NaCN zugegeben. Angegeben ist der Wert 1 min nach Zugabe von NaCN. Kontrollversuche wurden in Abwesenheit von NaCN und Glukose durchgeführt (unterbrochene Linien). *Links:* Die Zugabe von Glukose reduzierte deutlich die NaCN-induzierte Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$. *Rechts:* Nach Zugabe von NaCN allein ist die zytosolische ATP-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle geringfügig niedriger. In den Experimenten mit NaCN + Glukose ist die ATP-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle unverändert. 100 % ATP entspricht einem ATP-Gehalt von $17,6 \pm 1,1$ nmol / mg Protein ($n = 18$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE von $n = 6$ Zellkulturen aus drei unabhängigen Zellpräparationen. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle; # $P < 0,05$; n.s., nicht signifikant verschieden.

3.8 Einfluss der metabolischen Hemmung auf den Ca^{2+} -Einstrom

Weitere Experimente sollten klären, ob die metabolische Hemmung von Endothelzellen einen Ca^{2+} -Einstrom zur Folge hat. Dazu wurden zu glykolytisch gehemmten Endothelzellen extrazellulär 100 μM MnCl_2 gegeben (Abb. 3.9). Mn^{2+} löscht das Fluoreszenzsignal Fura 2-beladener Endothelzellen und dient somit als Indikator für den Ca^{2+} -Einstrom. Die Abnahme der Fluoreszenz verlief zunächst parallel in Versuchen mit und ohne Mn^{2+} . Erst zwei bis drei Minuten nach Zugabe von 2-DG nahm die Fluoreszenz in Anwesenheit von MnCl_2 stärker ab.

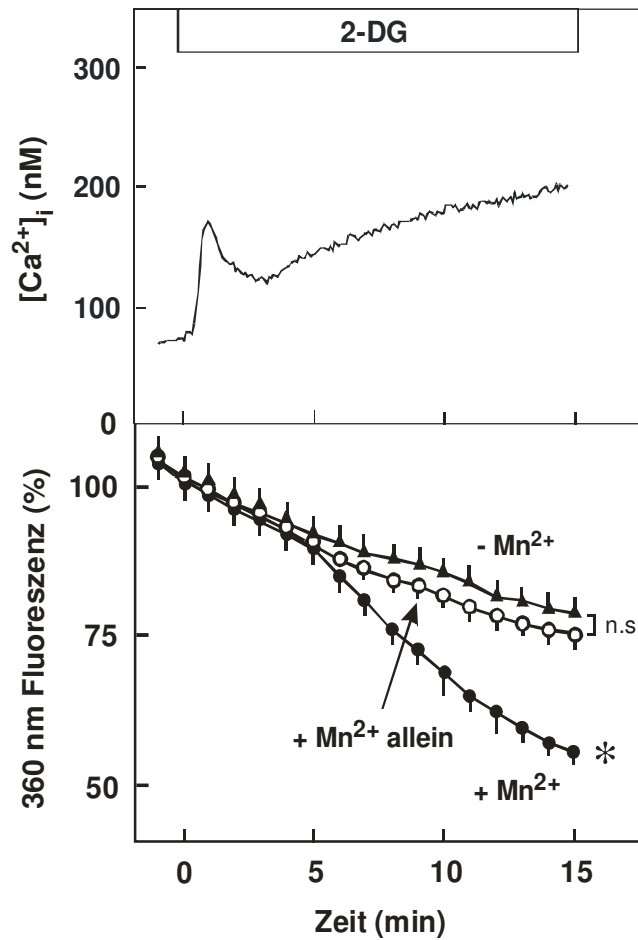


Abbildung 3.9:

Wirkung von 2-DG auf $[Ca^{2+}]_i$ und die Mn^{2+} -induzierte Abnahme der Fura 2-Fluoreszenz.

Oben: Originalregistrierung von $[Ca^{2+}]_i$ in Gegenwart von 10 mM 2-DG. *Unten:* Fura 2-Fluoreszenz bei 510 nm und einer Anregung mit 360 nm nach gemeinsamer Zugabe von 100 μ M Mn^{2+} + 10 mM 2-DG zum Zeitpunkt 0 (+ Mn^{2+} , ●), in alleiniger Gegenwart von 100 μ M Mn^{2+} (+ Mn^{2+} allein, ○) oder alleiniger Gegenwart von 10 mM 2-DG (- Mn^{2+} , ▲). Die Werte sind angegeben in Prozent bezogen auf den Wert zum Zeitpunkt 0 min. Während des Phase 1- $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs war die Fura 2-Fluoreszenz vom Mn^{2+} -Einstrom unabhängig. Der Phase 2- $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg im weiteren Verlauf geht hingegen mit einem Einstrom von Mn^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum einher. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE von n = 50 Zellen. *P < 0,05 vs. + Mn^{2+} allein oder - Mn^{2+} ; n.s., nicht signifikant verschieden.

Analog zu den Experimenten mit 2-DG wurde untersucht, ob die Zugabe von NaCN einen Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran auslöst (Abb. 3.10). Es zeigte sich, dass die Fura 2-Fluoreszenz in Gegenwart und in Abwesenheit von $100\text{ }\mu\text{M}$ MnCl_2 während der ersten zwei Minuten in gleicher Weise abnahm. In den folgenden Minuten fiel jedoch die Fura 2-Fluoreszenz in Gegenwart von Mn^{2+} deutlich stärker ab.

Diese Befunde zeigen, dass während der frühen Phase der metabolischen Hemmung kein gesteigerter Einstrom von Ca^{2+} -Ionen stattfand, sondern erst zwei bis drei Minuten nach Zugabe der Hemmstoffe.

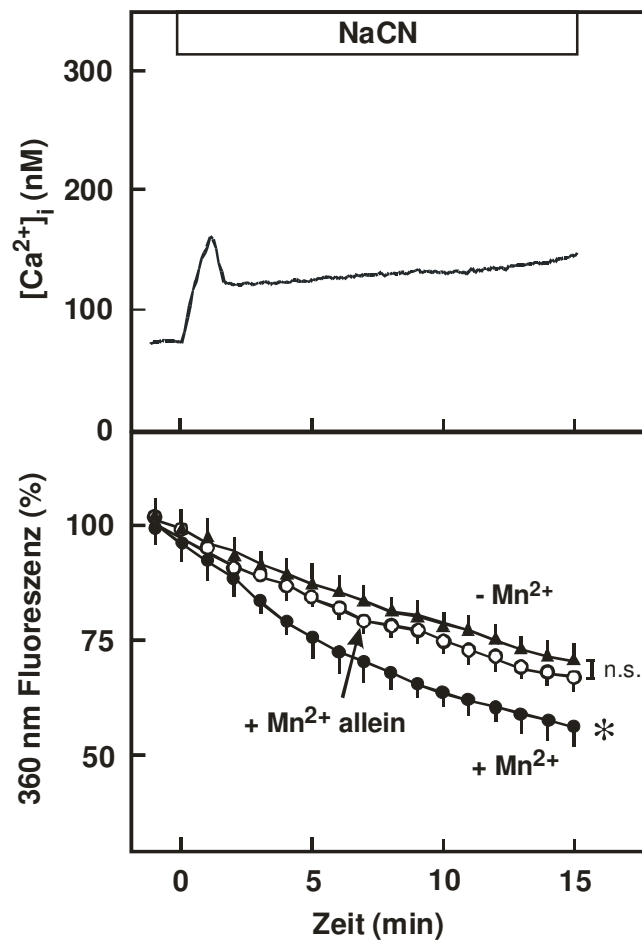


Abbildung 3.10:

Wirkung von NaCN auf $[Ca^{2+}]_i$ und die Mn^{2+} -induzierte Abnahme der Fura 2-Fluoreszenz.

Oben: Originalregistrierung der $[Ca^{2+}]_i$ in Gegenwart von 5 mM NaCN. *Unten:* Fura 2-Fluoreszenz bei 510 nm und einer Anregung mit 360 nm nach gemeinsamer Zugabe von 100 μ M Mn^{2+} + 5 mM NaCN zum Zeitpunkt 0 (+ Mn^{2+} , ●), in alleiniger Gegenwart von 100 μ M Mn^{2+} (+ Mn^{2+} allein, ○) oder alleiniger Gegenwart von 5 mM NaCN (- Mn^{2+} , ▲). Die Werte sind angegeben in Prozent bezogen auf den Wert zum Zeitpunkt 0 min. Während der ersten Phase des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs war die Fura 2-Fluoreszenz vom Mn^{2+} -Einstrom unabhängig. Der zweite $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg im weiteren Verlauf hingegen geht mit einem Einstrom von Mn^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum einher. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE von n = 50 Zellen. *P < 0,05 vs. + Mn^{2+} allein oder - Mn^{2+} ; n.s., nicht signifikant verschieden.

3.9 Wirkung einer Vorbehandlung der Endothelzellen mit Thapsigargin auf den 2-Desoxyglukose-induzierten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration

Um zu überprüfen, ob der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg nach metabolischer Hemmung auf einer Entleerung des ER beruht, wurden die Endothelzellen zunächst über 15 Minuten mit Thapsigargin (THG, 10 nM) vorbehandelt und anschließend die Glykolyse durch 2-DG gehemmt (Abb. 3.11). THG ist ein Hemmstoff der Ca^{2+} -ATPase am ER. Wird diese Ca^{2+} -ATPase ausgeschaltet, ist die Rückspeicherung von Ca^{2+} -Ionen in das ER nicht möglich. Die THG-Konzentration wurde mit 10 nM so gewählt, dass das ER entleert wurde ohne einen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg auszulösen (Thastrup et al., 1989 und 1990). Wurde anschließend 2-DG zu derartig vorbehandelten Endothelzellen gegeben, war der 2-DG-induzierte Phase 1- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg nahezu vollständig unterdrückt und der Phase 2-Anstieg deutlich reduziert.

Am Ende der THG-Vorbehandlung wurde überprüft, ob die Endothelzellen noch Ca^{2+} aus dem ER freisetzen können, d.h. ob das ER durch das vorausgegangene Manöver entspeichert wurde. Dazu wurde die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER durch Zugabe von extrazellulärem ATP (10 μM) stimuliert. Diese Entspeicherung wird von ATP über endotheliale P2Y-Rezeptoren vermittelt. Wie eine Vielzahl von Studien belegen, koppeln endotheliale Purinrezeptoren der Plasmamembran über G-Proteine an die PLC, welche PIP_2 zu IP_3 und Diacylglycerol hydrolysiert. IP_3 diffundiert ins Zytosol und öffnet den IP_3 -Rezeptor am ER, wodurch Ca^{2+} aus dem ER strömt (siehe Einleitung). Als gut charakterisiert kann die Expression von P2Y1, P2Y2, P2Y6, P2Y11 angesehen werden (Erlinge und Burnstock, 2008). Neben diesen G-Protein-gekoppelten Purinrezeptoren werden von Endothelzellen auch noch ionotrope Purinrezeptoren, wie z.B. P2X4 oder P2X2-Rezeptoren exprimiert. Diese sind Kationenkanäle und vermitteln einen langsam progredienten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg.

Im Ergebnis wurde deutlich, dass nach THG-Vorbehandlung der ATP-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg im Vergleich zu dem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg in nicht behandelten Zellen um $71 \pm 8 \%$ ($n = 60$) vermindert war (Daten nicht gezeigt).

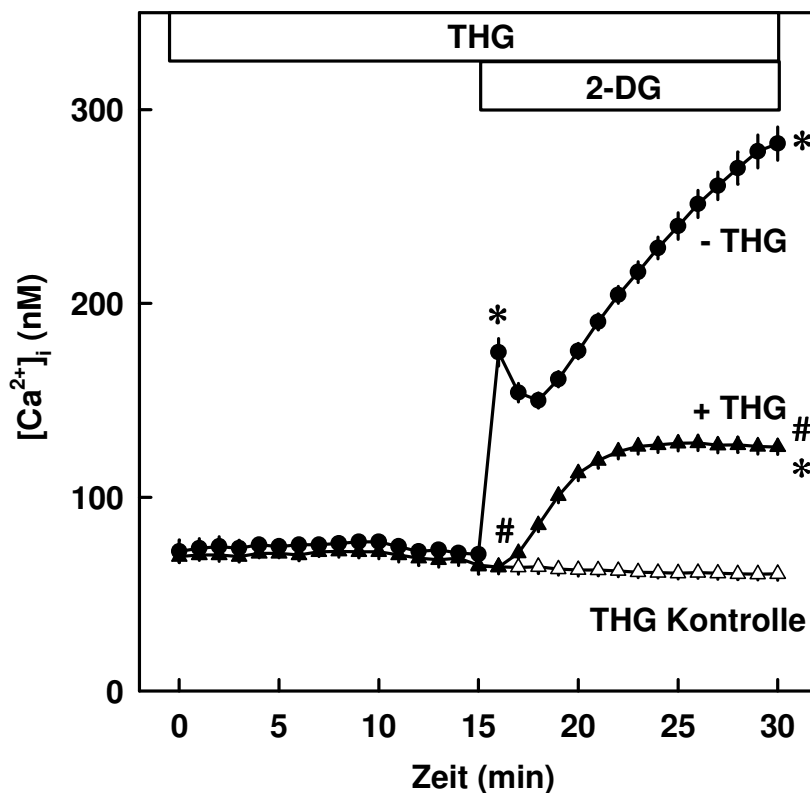


Abbildung 3.11:

Wirkung einer THG-Vorbehandlung auf den 2-DG-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg.

Endothelzellen wurden entweder in Gegenwart (+ THG, ▲) oder in Abwesenheit (- THG, ●) von 10 nM THG, einem Hemmstoff der Ca^{2+} -ATPase des endoplasmatischen Retikulums, für 15 min vorinkubiert. Anschließend wurden 10 mM 2-DG zugegeben. Kontrollversuche (Δ) wurden ohne 2-DG in Gegenwart von THG durchgeführt. In THG-vorbehandelten Zellen war die erste Phase des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs aufgehoben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE von $n = 60$ Zellen. * $P < 0,05$ vs. THG Kontrolle; # $P < 0,05$ vs. 2-DG allein.

3.10 Wirkung von Thapsigargin auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration bei simultaner Zugabe mit 2-Desoxyglukose

In einer nächsten Serie von Experimenten wurde THG (10 nM) gleichzeitig mit 2-DG zugegeben, um die Ca^{2+} -ATPase mit Beginn der metabolischen Hemmung auszuschalten. Wie in Abb. 3.12 dargestellt ist, beschleunigte und vergrößerte THG den 2-DG-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Auch der Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ -Überladung war in Gegenwart von THG plus 2-DG im Vergleich zu 2-DG allein deutlich verändert: Der

Phase 1- $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg trat schneller auf und $[Ca^{2+}]_i$ erreichte höhere Werte, wenn THG plus 2-DG zugegeben wurden. Der typische transiente $[Ca^{2+}]_i$ -Abfall nach dem Phase 1-Anstieg war aufgehoben und $[Ca^{2+}]_i$ blieb auf einem hohen Niveau. Die alleinige Zugabe von THG (10 nM) hatte keine Wirkung auf $[Ca^{2+}]_i$ (Daten nicht aufgeführt).

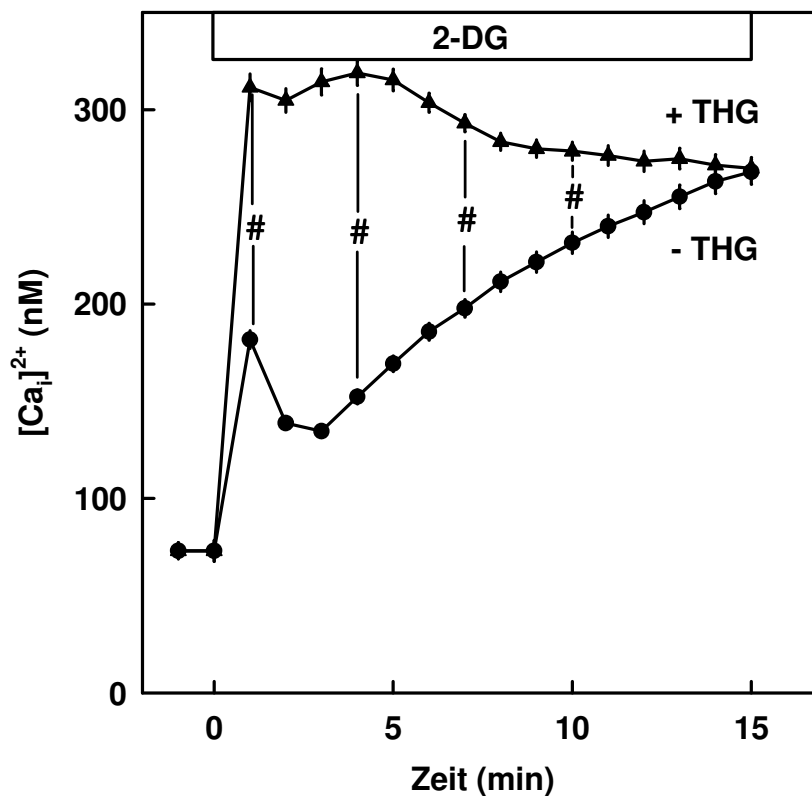


Abbildung 3.12:

Wirkung von THG auf den 2-DG-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg.

Endothelzellen wurden entweder in Gegenwart von 10 mM 2-DG (- THG, ●) oder in Gegenwart von 10 nM THG + 10 mM 2-DG (+ THG, ▲) inkubiert. Bei gleichzeitiger Zugabe von 2-DG + THG trat die $[Ca^{2+}]_i$ -Überladung schneller ein und erreichte höhere Werte. Der typische biphasische $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg trat dabei nicht auf. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE von n = 80 Zellen. $^{\#}P < 0,05$ vs. 2-DG allein.

3.11 Einfluss von Thapsigargin auf den Ca^{2+} -Einstrom in 2-Desoxyglukose-behandelte Endothelzellen

Um zu testen, ob die erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Gegenwart von 10 nM THG plus 10 mM 2-DG durch einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum bedingt ist, wurde wie oben die Mn^{2+} -induzierte Abnahme der Fura 2-Fluoreszenz bestimmt (Abb. 3.13). In den ersten zwei bis drei Minuten war im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne Mn^{2+} nahezu kein Unterschied in der Fura 2-Fluoreszenz erkennbar. Anschließend jedoch nahm das Fluoreszenzsignal in Gegenwart von 100 μM Mn^{2+} stärker ab. Ein Einstrom von Ca^{2+} -Ionen setzte also erst zwei bis drei Minuten nach Zugabe von THG + 2-DG ein.

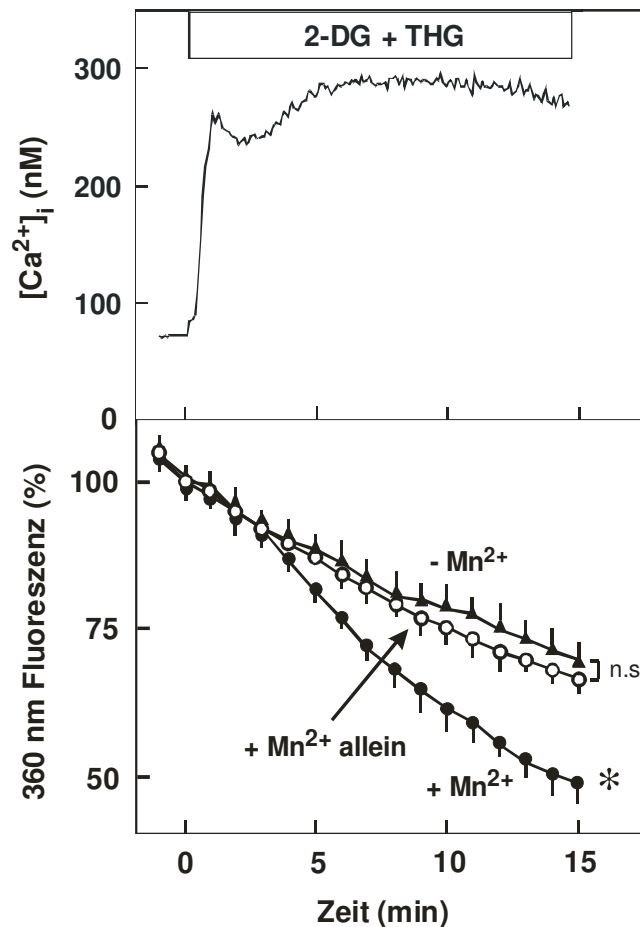


Abbildung 3.13:

Wirkung der gleichzeitigen Zugabe von THG + 2-DG auf $[Ca^{2+}]_i$ und die Mn^{2+} -induzierte Abnahme der Fura 2-Fluoreszenz.

Oben: Originalregistrierung der $[Ca^{2+}]_i$ in Gegenwart von 10 nM THG + 10 mM 2-DG.

Unten: Fura 2-Fluoreszenz bei 510 nm und einer Anregung bei 360 nm nach gemeinsamer Zugabe von 100 μM Mn^{2+} + 10 nM THG + 10 mM 2-DG zum Zeitpunkt 0 (+ Mn^{2+} , ●), in alleiniger Gegenwart von 100 μM Mn^{2+} (+ Mn^{2+} allein, ○) oder alleiniger Gegenwart von 10 nM THG + 10 mM 2-DG (- Mn^{2+} , ▲). Die Werte sind angegeben in Prozent bezogen auf den Wert zum Zeitpunkt 0 min. Während des frühen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs war die Fura 2-Fluoreszenz vom Mn^{2+} -Einstrom unabhängig. Der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg im weiteren Verlauf hingegen geht mit einem Einstrom von Mn^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum einher. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE von $n = 50$ Zellen. * $P < 0,05$ vs. + Mn^{2+} allein oder - Mn^{2+} ; n.s., nicht signifikant verschieden.

3.12 Wirkung von Cyclopiazonsäure auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration bei simultaner Zugabe mit 2-Desoxyglukose

In anschließenden Versuchen wurde zu Endothelzellen 1 μM Cyclopiazonsäure (CPA) zeitgleich mit 2-DG gegeben (Abb. 3.14). CPA ist ein weiterer Hemmstoff der Ca^{2+} -ATPase am ER, der sich in seiner chemischen Struktur von THG unterscheidet (Monqoc et al., 2007). Auch in diesen Experimenten wurde deutlich, dass der Phase 1- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg nach Zugabe von CPA plus 2-DG schneller und höher war, als nach alleiniger Zugabe von 2-DG. Die anschließende $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Abnahme war ebenfalls reduziert und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hielt sich über den gesamten Versuchszeitraum auf einem hohen Niveau. CPA (1 μM) allein hatte keinen Einfluss auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Daten nicht gezeigt).

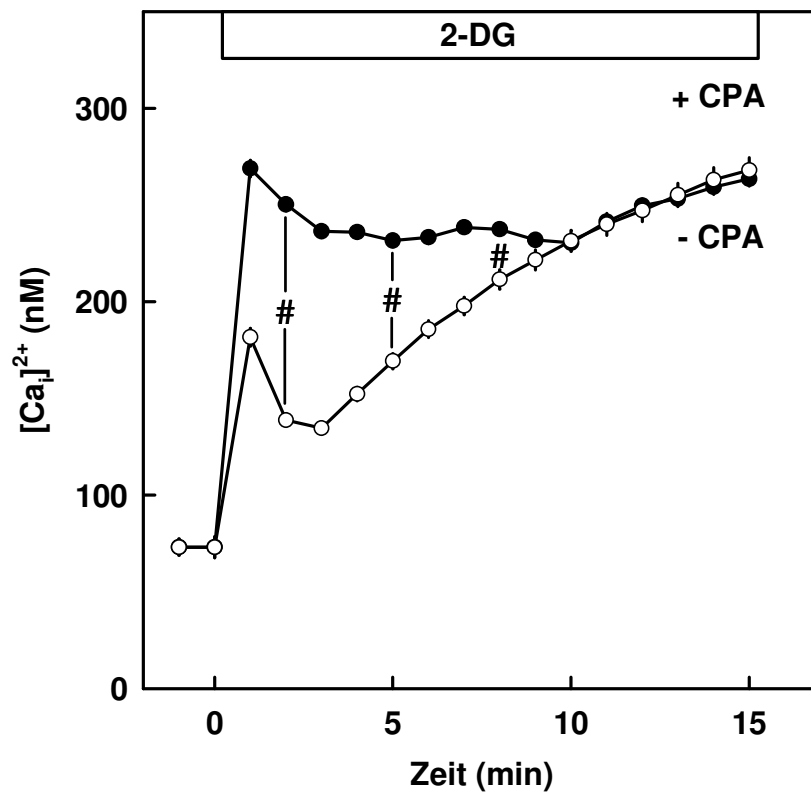


Abbildung 3.14:

Wirkung von CPA auf den 2-DG-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg.

Endothelzellen wurden entweder in Gegenwart von 10 mM 2-DG (- CPA, ○) oder von 10 nM CPA + 10 mM 2-DG (+ CPA, ●) inkubiert. Bei gleichzeitiger Zugabe von 2-DG + CPA trat die $[Ca^{2+}]_i$ -Überladung schneller ein und erreichte höhere Werte. Der typische biphasische $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg trat dabei nicht auf. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE von $n = 80$ Zellen. [#]P < 0,05 vs. 2-DG allein.

Der Einfluss von THG oder CPA bei simultaner Zugabe mit 2-DG wurde besonders in der frühen Phase deutlich (Abb. 3.15). So war die Anstiegsgeschwindigkeit der $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme in den ersten drei Minuten gegenüber der alleinigen Zugabe von 2-DG um das 1,6 fache erhöht. Dagegen war die Abnahmegeschwindigkeit im Mittel um fast die Hälfte reduziert.

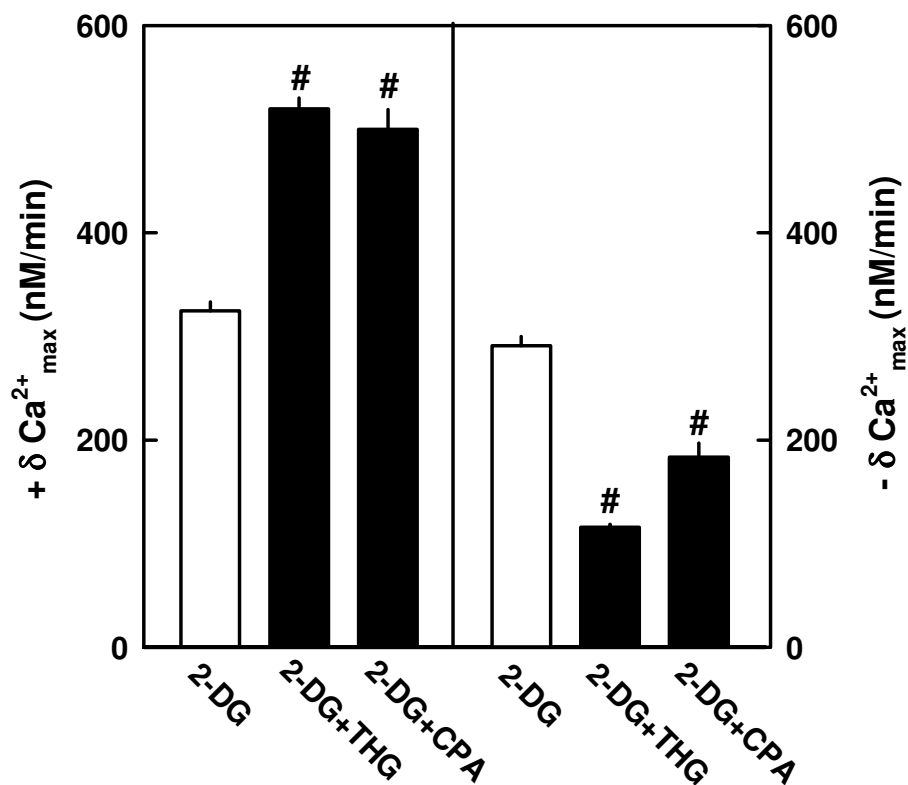


Abbildung 3.15:

Wirkung von THG und CPA auf die 2-DG-induzierte maximale Anstiegsgeschwindigkeit ($+\delta_{max} Ca^{2+}$, links) und die maximale Abnahmegeschwindigkeit ($-\delta_{max} Ca^{2+}$, rechts) von $[Ca^{2+}]_i$ während der ersten drei Minuten nach Zugabe von 2-DG.

Endothelzellen wurden entweder mit 10 mM 2-DG allein, 10 mM 2-DG + 10 nM THG oder mit 10 mM 2-DG + 1 μ M CPA inkubiert. In Gegenwart von THG, bzw. CPA war die Geschwindigkeit des 2-DG-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs um das 1,6 fache gesteigert und die anschließende $[Ca^{2+}]_i$ -Abnahme war deutlich reduziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE von n = 80 Zellen. [#]P < 0,05 vs. 2-DG allein.

3.13 Einfluss von Xestospongin C auf den zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg in metabolisch gehemmten Endothelzellen

Eine weitere Versuchsreihe wurde mit Xestospongin C (XeC), einem spezifischen Hemmstoff der IP_3R am ER, durchgeführt (Gafni et al., 1997) (Abb. 3.16). 3 μM XeC wurden Endothelzellen 20 Minuten vor der metabolischen Hemmung mit 10 mM 2-DG oder 5 mM NaCN zugegeben. Das Resultat war, dass sowohl der Phase 1- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg als auch der Phase 2-Anstieg vollständig aufgehoben wurden.

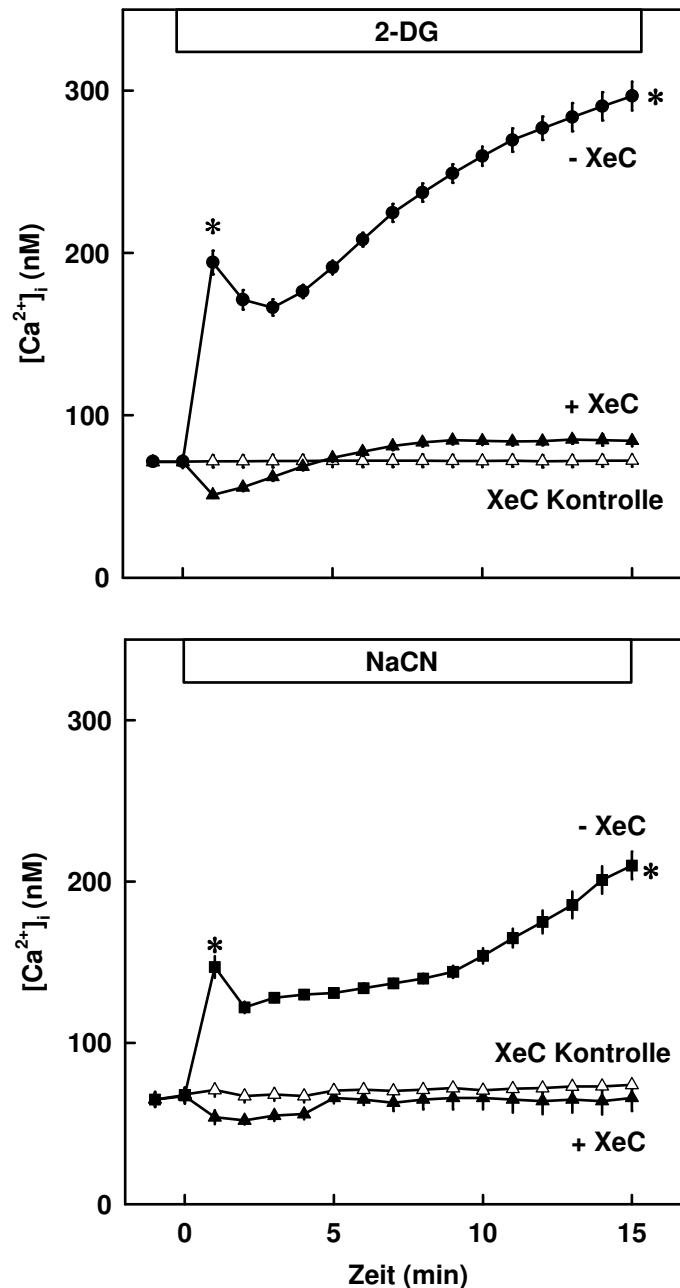


Abbildung 3.16:

Wirkung von XeC auf den 2-DG- oder den NaCN-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg.

Endothelzellen wurden für 20 min in Abwesenheit (- XeC, ●) oder in Gegenwart von 3 μ M XeC (+ XeC, ▲) inkubiert. Anschließend wurden 10 mM 2-DG oder 5 mM NaCN zugegeben. XeC hob den 2-DG-, bzw. NaCN-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg auf. Kontrollversuche (Δ) wurden in Gegenwart von 3 μ M XeC in substratfreiem Medium durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE von n = 60 Zellen. *P < 0,05 vs. XeC Kontrolle.

3.14 Einfluss von Ryanodin auf den zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg in metabolisch gehemmten Endothelzellen

Wie in den Experimenten mit XeC wurde Ryanodin (25 μM), ein Hemmstoff der RyR, zur 20-minütigen Vorbehandlung der Endothelzellen eingesetzt und anschließend 10 mM 2-DG oder 5 mM NaCN zugegeben. Es zeigte sich, dass Ryanodin auf den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg nach metabolischer Hemmung keine Wirkung hatte (Daten nicht gezeigt).

3.15 Einfluss von Xestospongin C auf die interendotheliale Lückenbildung nach metabolischer Hemmung

In einer nächsten Versuchsreihe wurde untersucht, ob die Hemmung der IP_3R durch XeC die interendotheliale Lückenbildung nach metabolischer Hemmung beeinflusst (Abb. 3.17). Dazu wurden Endothelzellen über 20 Minuten in Gegenwart von 3 μM XeC inkubiert und anschließend 10 mM 2-DG oder 5 mM NaCN zugegeben. Jeweils 1 und 15 Minuten nach Zugabe der Hemmstoffe wurde die Lückenbildung gemessen. Das Ergebnis war, dass durch die Behandlung der Endothelzellen mit XeC die Bildung interendothelialer Lücken ausblieb.

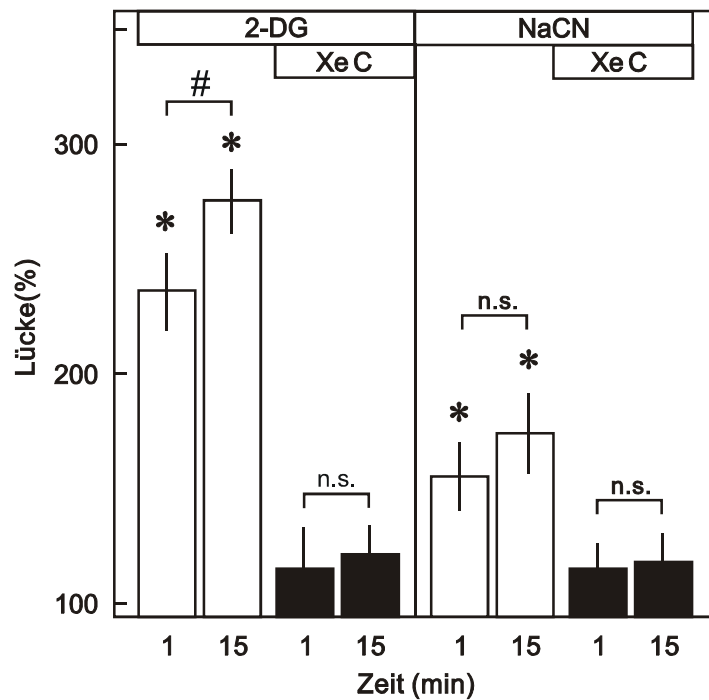


Abbildung 3.17:

Wirkung von XeC auf die 2-DG- oder NaCN-induzierte Lückenbildung 1 min und 15 min nach Zugabe der metabolischen Hemmstoffe.

Endothelzellen wurden für 20 min in Abwesenheit von XeC oder in Gegenwart von 3 μ M XeC inkubiert. Anschließend wurden 10 mM 2-DG oder 5 mM NaCN zugegeben. Kontrollversuche wurden in Abwesenheit und Gegenwart von 3 μ M XeC in substratfreiem Medium durchgeführt. Unter beiden Kontrollbedingungen änderte sich die Lückenbildung während des Beobachtungszeitraums nicht. XeC hob die 2-DG-, bzw. NaCN-induzierte Lückenbildung nahezu auf. Die Lückenbildung vor Zugabe der metabolischen Hemmstoffe wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE von n = 60 Zellen. *P < 0,05 vs. Kontrolle; #P < 0,05; n.s., nicht signifikant verschieden.

4. Diskussion

Schon in früheren Arbeiten ist gezeigt worden, dass Endothelzellen auf Störungen des Energiestoffwechsels mit einem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg reagieren (Ziegelstein et al., 1994; Noll et al., 1995). Ein Entgleisen der $[Ca^{2+}]_i$ -Homöostase führt zu funktionellen Änderungen des Endothels, wie dem Versagen der endothelialen Schrankenfunktion und der daraus resultierenden Ödembildung. Diese Studie verfolgte das Ziel, die Mechanismen zu analysieren, die diesem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg zugrunde liegen. Das Verständnis dieser Mechanismen liefert den Ansatz einer pathophysiologischen Situation nach Ischämie und / oder Reperfusion vorzubeugen.

Die wesentlichen Ergebnisse sind:

1. In kultivierten aortalen Endothelzellen des Schweins induzierte die metabolische Hemmung mit 2-DG und / oder NaCN einen biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Zeitgleich mit dem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg traten interendotheliale Lücken auf.
2. Pyruvat, ein Substrat der mitochondrialen ATP-Synthese, hatte auf den 2-DG-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg keinen Einfluss. Dagegen war in Gegenwart von Glukose, einem Substrat der Glykolyse, der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg nach Hemmung der Endothelzellen mit NaCN nahezu aufgehoben.
3. Zum Zeitpunkt des $[Ca^{2+}]_i$ -Maximums, während des Phase 1-Anstiegs nach metabolischer Hemmung, war die zytosolische ATP-Konzentration unverändert.
4. Diese Wirkungen einer metabolischen Hemmung auf $[Ca^{2+}]_i$ wurden nicht nur in kultivierten Endothelzellen der ersten Passage, sondern auch in frischen Endothelzellen auf Aortensegmenten nachgewiesen.
5. Der Phase 1- $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg beruht auf einer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER und der Phase 2- $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg resultiert aus einem Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran.
6. Die langsame Ca^{2+} -Entspeicherung des ER induziert durch THG, ein Hemmstoff der ER- Ca^{2+} -ATPase, hob den 2-DG-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg der Phase 1 auf und verringerte den Phase 2- $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg.
7. Die gleichzeitige Hemmung der ER- Ca^{2+} -ATPase mit THG oder CPA und der Glykolyse mit 2-DG beschleunigte und vergrößerte den Phase 1- $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Im weiteren Versuchsverlauf blieb $[Ca^{2+}]_i$ auf einem hohen Niveau.

8. XeC, ein spezifischer Hemmstoff der IP_3R am ER, verhinderte sowohl den Phase 1- $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg als auch den Phase 2-Anstieg nach glykolytischer oder mitochondrialer Hemmung in Endothelzellen. Dagegen zeigte Ryanodin, ein spezifischer Hemmstoff der RyR, keinen Einfluss auf den biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg.
9. Wurde der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg mit XeC unterbunden, so blieb auch die interendotheliale Lückenbildung aus.

Endothelzellen reagieren auf die metabolische Hemmung mit einem biphasischen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration

In dieser Studie wurden 2-DG und NaCN als Hemmstoffe der ATP-Synthese in Endothelzellen eingesetzt. 2-DG unterscheidet sich in seiner chemischen Struktur von Glukose und wird nicht über die Glykolyse abgebaut. NaCN hemmt die mitochondriale Energiebereitstellung, indem es die Cytochrom c Oxidase in den Mitochondrien blockiert.

Als Monosaccharide sind Glukose und deren Derivat 2-DG aufgrund ihrer polaren Struktur gut wasserlöslich und damit im Blut leicht zu den Zielzellen transportierbar. Um allerdings die Zellmembranen passieren zu können, braucht die Glukose Transportproteine, die so genannten Glukosetransporter (GLUT). GLUT stellen transmembranäre Proteinkomplexe dar, die 12 amphiphile Domänen besitzen. Amino- und Carboxylende liegen intrazellulär (Mann et al., 2003). Das Ankoppeln von Glukose führt zu einer Konformationsänderung der GLUT, und die Glukose kann die Zellmembran passieren. GLUT gehören zu der sogenannten „Major Facilitate Superfamily“. Nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion gelangt Glukose ohne Energieverbrauch in die Zelle, bzw. aus der Zelle heraus. Allein der Konzentrationsunterschied zwischen Extra- und Intrazellulärraum ist die treibende Kraft. Mittlerweile sind 13 solcher GLUT identifiziert worden, die in drei Klassen eingeteilt werden: Typ 1, Typ 2 und Typ 3. Zu den Typ 1 GLUT gehören GLUT 1- 4, wobei GLUT 1 der am weitesten verbreitete Typ ist und in großer Zahl in Erythrozyten und Endothelzellen exprimiert wird (Mann et al., 2003). Gaudreault et al. (2004) konnten zeigen, dass Endothelzellen der Rattenarterien mit dem Na^+ / Glukose-Symporter über ein aktives Glukose-Transportsystem verfügen

können. In diesem System wird der Na^+ -Konzentrationsgradient für den Co-Transport der Glukose in die Zellen genutzt.

Wie die Glukose wird auch 2-DG über die genannten Transportsysteme in die Zelle hinein und aus der Zelle heraus geschleust (Gaudreault et al., 2008).

Der Abbau der Glukose unter ATP-Gewinnung erfolgt über die Glykolyse. Zunächst wird die Glukose durch die Hexokinase phosphoryliert und mit Hilfe der Isomerase zu Fructose-6-Phosphat umgewandelt. Nach einer weiteren Phosphorylierung durch die Phosphofructokinase wird der C6-Körper mittels der Aldolase in zwei C3-Körper, das Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und das Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP), gespalten. Diese Verbindungen können über die Triosephosphat-Isomerase rasch ineinander umgewandelt werden. Nur GAP wird weiter phosphoryliert und oxidiert und es entsteht 1,3-Bisphosphoglycerat. Die Elektronen werden auf NAD^+ und ein Phosphat auf ADP übertragen und anschließend Wasser abgespalten. Mit Hilfe der Pyruvat-Kinase entsteht im letzten Schritt ATP und Pyruvat. Die Bilanz der Glykolyse lautet: $\text{Glukose} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{ADP} + 2\text{P} \rightarrow 2 \text{Pyruvat} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 2 \text{ATP} + 2 \text{H}_2\text{O}$.

Das Pyruvat erfährt an dem Multienzymkomplex Pyruvat-Dehydrogenase eine oxidative Decarboxylierung. In der weiteren Reaktionsfolge entstehen aus dem Pyruvat CO_2 , $\text{NADH} + \text{H}^+$ und Acetyl-CoA. Das Acetyl-CoA wird zum größten Teil in den Citratzyklus eingespeist. Bei Vorhandensein von ausreichend NADH kann ein Überschuss an Acetyl-CoA in Fett verwandelt werden. Anaerob wird Pyruvat zu Lactat reduziert.

Der Citratzyklus findet in den Mitochondrien statt. In ihm wird Acetyl-CoA zu Kohlenstoffdioxid (CO_2), NADH , FADH_2 , ATP und GTP verstoffwechselt. Die im Citratzyklus gewonnenen Elektronen, die an den Coenzymen NAD^+ und FAD gebunden sind, werden der Atmungskette zugeführt.

2-DG unterscheidet sich von der Glukose in seiner Struktur durch ein Wasserstoff anstelle einer Hydroxylgruppe am zweiten C-Atom. Dadurch bedingt wird 2-DG zwar mittels der Hexokinase zu 2-Desoxyglukose-6-Phosphat phosphoryliert, kann aber den weiteren Weg der Glykolyse nicht durchlaufen. Somit akkumuliert 2-DG, bzw. seine phosphorylierte Form, in der Endothelzelle und hemmt damit die Glykolyse sowie deren ATP-Synthese (Sokoloff et al., 1977).

Die biochemische Funktion der Atmungskette ist es, Energie in Form von ATP zu speichern. Die Redoxsysteme der Atmungskette und das daran gekoppelte

Phosphorylierungssystem sind, ausgenommen von Cytochrom c, in der inneren Mitochondrienmembran integriert. Die innere Membran umschließt den Matrixraum und ist von der äußeren Membran durch den Zwischenmembran- oder Intercristaeraum getrennt. Die Proteinkomplexe der Atmungskette wirken als Oxidoreduktasen und werden als Komplex I – IV bezeichnet (I: NADH-Dehydrogenase, II: Succinat-Dehydrogenase, III: Ubichinon bc₁-Komplex, IV: Cytochrom c Oxidase). Zwischen diesen Komplexen verbinden die Redoxsysteme Ubichinon und Cytochrom c. Innerhalb der Komplexe werden Elektronen zwischen Zentren mit sehr unterschiedlichem Redoxpotential übertragen. Die dadurch entstehende freie Energie wird für den vektoriellen Transport von Protonen durch die innere Membran verwendet, wodurch ein Protonengradient erzeugt wird. Dieser elektrochemische Gradient stellt für die ATP-Synthese die treibende Kraft dar.

Die ATP-Synthese findet in einem weiteren integralen Enzymkomplex der Mitochondrienmembran statt, dem Komplex V oder der ATP-Synthase. Dieser Komplex V beinhaltet zwei funktionelle Untereinheiten, die als Kopplungsfaktoren F₀ und F₁ bezeichnet werden. F₀ bildet einen Protonenkanal, durch den die Protonen vom Zwischenmembranraum wieder in den Matrixraum zurückfließen, in dem Bestreben, den Protonengradienten auszugleichen. Der F₁-Teil katalysiert die chemische Reaktion von ADP zu ATP. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt, es wird aber angenommen, dass Konformationsänderungen an katalytischen Zentren des Enzyms während des Protonentransports für die Reaktion von Bedeutung sind.

Cyanid ist ein Hemmstoff der Cytochrom c Oxidase (Komplex IV). Die Cytochrom c Oxidase enthält zwei α-Untereinheiten des Häms (Häm aa₃) zur Reduktion von Sauerstoff. An dieses Häm aa₃ bindet Cyanid mit hoher Affinität, so dass hier die Kaskade der Elektronenübertragung abbricht. Das Fließgleichgewicht kommt zum Erliegen und es wird kein Protonengradient aufgebaut, der für die ATP-Synthese notwendig ist (Nicholls, 1982; Wilson et al., 1994).

Die vorliegende Studie zeigt, dass kultivierte aortale Endothelzellen auf eine Hemmung der glykolytischen und / oder mitochondrialen Energieproduktion mit einem Anstieg von [Ca²⁺]_i reagieren. Dieser [Ca²⁺]_i-Anstieg verläuft in zwei Phasen. Dabei sind der Zeitverlauf und die Änderungen des [Ca²⁺]_i-Niveaus reproduzierbar. Der Phase 1-[Ca²⁺]_i-Anstieg erreicht sein Maximum etwa eine Minute nach Zugabe der Hemmstoffe. Anschließend fällt [Ca²⁺]_i wieder ab und Phase 2, ein langsam

progressiver $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg, beginnt. Ein vergleichbares Antwortverhalten ist bereits früher in mikrovaskulären koronaren Endothelzellen der Ratte (Noll et al., 1995) und auch in makrovaskulären Endothelzellen der Rattenaorta (Ziegelstein et al., 1994) beobachtet worden. Diese Reaktion der Endothelzellen war reversibel und löste nicht den Untergang der Zellen aus. Somit untermauern die Befunde dieser Studie Ergebnisse früherer Arbeiten, dass Endothelzellen unterschiedlicher Spezies und Gefäßprovinzen auf eine metabolische Hemmung in gleicher Weise mit einer Änderung ihrer $[Ca^{2+}]_i$ -Homöostase reagieren. Dass für den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg ein genereller Mechanismus existiert, wird auch durch neuere Arbeiten bestätigt. Sie zeigen, dass Endothelzellen aus koronaren Endothelzellen der Ratte auf eine Hypoxie (Absenkung des O_2 -Partialdrucks unter 1 mm Hg) oder simulierte Ischämie (O_2 -Partialdrucks unter 1 mm Hg und Absenkung des pH auf 6.4) mit einem biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg reagieren (Abdallah et al., 2007; Gündüz et al., 2006).

Endothelzellen reagieren unterschiedlich auf die glykolytische oder mitochondriale Hemmung

Zur Analyse der metabolischen Ursache für den biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg wurden unabhängig voneinander die Glykolyse und die mitochondriale Atmung gehemmt. Dabei zeigte sich, dass Endothelzellen auf die Zugabe von 2-DG mit einem biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg reagierten, der mit zunehmender Konzentration des Hemmstoffs höher ausfiel. Die Hemmung der mitochondrialen Energiebereitstellung durch NaCN führte ebenfalls konzentrationsabhängig zu einem biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Dieser $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg war jedoch in seiner Höhe nicht so ausgeprägt wie der nach Hemmung der Glykolyse. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg vorrangig durch die glykolytische Hemmung bedingt ist. Diese Vermutung wird durch Experimente gestützt, in denen Endothelzellen vor 2-DG-Zugabe in Gegenwart von Pyruvat zur Steigerung der mitochondrialen Energieproduktion inkubiert wurden. Hier zeigte sich, dass Pyruvat die 2-DG-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Überladung der Endothelzellen in Phase 1 sogar steigerte. Der Phase 2- $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg war dagegen reduziert. Wurden die Endothelzellen jedoch vor NaCN-Zugabe in Gegenwart von Glukose zur Unterstützung der Glykolyse inkubiert, war der durch NaCN ausgelöste biphasische $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg nahezu aufgehoben.

Die Ursache für die Pyruvat-Wirkung auf $[Ca^{2+}]_i$ wurde in der Studie nicht näher untersucht. Es kann daher hier nur spekuliert werden, dass einerseits in Gegenwart von Pyruvat die Ca^{2+} -Speicher stärker gefüllt sind und der Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran vermindert wird. Durch eine Pyruvat-vermittelte Steigerung der ATP-Synthese kann die Ca^{2+} -Rückspeicherung ins ER unterstützt werden (Ferris et al., 1990). Damit könnte der Füllungszustand des ER zunehmen und bei Öffnung der IP_3R mehr Ca^{2+} aus dem ER freigesetzt werden (Zima et al., 2003). Darüber hinaus könnte eine Steigerung des lokalen Phosphorylierungspotentials den Ca^{2+} -Einstrom hemmen oder den Ca^{2+} -Auswärtstransport über die Plasmamembran steigern. Diese Vermutung wird durch Arbeiten gestützt, die zeigen, dass Mitochondrien an der Regulation des Ca^{2+} -Einstroms via Plasmamembran beteiligt sein können (Varadi et al., 2004). Wesentlich für die vorliegende Studie ist, dass extrazelluläres Pyruvat, welches die mitochondriale ATP-Synthese unterstützt, nicht zu einer Reduktion der $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort auf die Zugabe von 2-DG führt, während Glukose die Wirkung des mitochondrialen Hemmstoffs NaCN aufhebt.

Über die Ursachen der besonderen Empfindlichkeit für den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg nach Hemmung der glykolytischen Energieproduktion können an dieser Stelle nur Vermutungen geäußert werden. Eine mögliche Ursache könnte in einer Änderung der lokalen ATP-Konzentration am ER liegen. Das ER ist, wie oben beschrieben, der größte intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher und als solcher in vielen Zellfunktionen involviert. Es ist gezeigt worden, dass die Kaskade der glykolytischen Enzyme eng mit dem ER assoziiert ist (Xu et al., 1995). Für die Änderung einer lokalen ATP-Konzentration als Trigger für den initialen Ca^{2+} -Anstieg sprechen die Daten der vorliegenden Untersuchung, die zeigen, dass der initiale $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg zu einem Zeitpunkt auftrat, an dem die Änderungen im Gesamt-ATP-Gehalt der Endothelzellen nur sehr gering waren. Dies zeigte sich auch in Versuchen, in denen die Endothelzellen mit 2-DG (plus Pyruvat) oder NaCN (plus Glukose) behandelt worden waren. Globale Schwankungen des ATP-Gehalts sind daher als Auslöser für den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg wenig wahrscheinlich.

Zytosolischer Ca^{2+} -Anstieg nach metabolischer Hemmung auch in-vivo

Ein ganz wesentliches Ergebnis dieser Untersuchung ist, dass der an einem Modell kultivierter Endothelzellen identifizierte Mechanismus auch in frischen Endothelzellen auf der Aortengefäßwand festgestellt werden konnte. Die Versuche bestätigten, dass auch im Endothel einer intakten Intima Pyruvat den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg durch 2-DG in der Weise beeinflusst, dass der Phase 1- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg leicht gesteigert und der Phase 2-Anstieg vermindert wird. Dagegen kompensiert Glukose nahezu den NaCN-induzierten biphasischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg. Diese Befunde demonstrieren, dass auch frische Endothelzellen *in-situ* auf eine metabolische Hemmung mit einem biphasischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg reagieren und dass die Hemmung der Glykolyse für die Induktion der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Überladung von entscheidender Bedeutung ist.

Mechanismus des zytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs

Wie die Experimente der vorliegenden Studie zeigen, setzte der Manganeinstrom via Plasmamembran nicht unmittelbar mit dem Beginn der metabolischen Hemmung, sondern erst nach zwei bis drei Minuten ein und wurde im weiteren Verlauf der metabolischen Hemmung stärker. Dies zeigt, dass der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum nicht am Ca^{2+} -Anstieg der Phase 1 beteiligt ist, wohl aber am langsam progressiven $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg der Phase 2. Der Phase 1- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg muss daher durch die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern entstehen. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Arbeiten überein, in denen unter extrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen zum Zeitpunkt der metabolischen Hemmung nur der Phase 1- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg auftrat, der Phase 2-Anstieg hingegen ausblieb (Noll et al., 1995; Muhs et. al, 1997).

Um diese Hypothese zu stützen, wurde das ER als endogener Ca^{2+} -Speicher durch ein besonderes Manöver entleert. Dazu wurde die ER- Ca^{2+} -ATPase der Endothelzellen 15 Minuten vor 2-DG-Zugabe mit 10 nM THG gehemmt. Es ist bekannt, dass THG in hohen Konzentrationen eine rasche Entspeicherung des ER und konsekutiv einen Ca^{2+} -Einstrom in Zellen auslöst. In so geringer Konzentration wie in diesen Experimenten eingesetzt, bleibt diese Reaktion jedoch aus und THG bewirkt eine langsame Entspeicherung des ER (Thastrup et al., 1990). In derart

vorbehandelten Endothelzellen trat der Phase 1- $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg nicht auf und der Phase 2-Anstieg war deutlich reduziert. Diese Ergebnisse unterstützen die Vorstellung, dass eine metabolische Hemmung zu einer Ca^{2+} -Entspeicherung des ER führt.

Es stellte sich daher die Frage, ob die Ursache für die ER-Entleerung in einem Versagen der Ca^{2+} -ATPase liegt, d.h. auf einer insuffizienten Rückspeicherung von Ca^{2+} ins ER beruht, und / oder Folge einer verstärkten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zeitgleich die ER- Ca^{2+} -ATPase mit THG und die Glykolyse mit 2-DG in Endothelzellen gehemmt, deren ER nicht zuvor einer Ca^{2+} -Entspeicherung unterzogen worden waren. Unter diesem Manöver stieg $[Ca^{2+}]_i$ schneller und höher an, als in alleiniger Gegenwart von 2-DG. Ganz ähnliche Ergebnisse wurden mit Cyclopiazonsäure erhalten. CPA ist ein zu THG chemisch unterschiedlicher Hemmstoff der ER- Ca^{2+} -ATPase (Monqoc et al., 2007). Diesen Ergebnissen zur Folge ist unter glykolytischer Hemmung die Ca^{2+} -Rückspeicherung über die ER- Ca^{2+} -ATPase nicht limitiert. Denn eine aktive Ca^{2+} -ATPase verhindert einen sonst höheren $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Die Analyse des ManganEinstroms belegt, dass zum Zeitpunkt der Phase 1 kein Ca^{2+} -Einstrom stattfindet. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass THG einen Ca^{2+} -Einstrom während der Phase 1 induziert.

Eine Bestätigung dieser Ergebnisse lieferte die Betrachtung der Geschwindigkeiten der $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen. Während des Phase 1- $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs wurden die Geschwindigkeiten des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs bzw. der $[Ca^{2+}]_i$ -Abnahme in den ersten drei Minuten nach glykolytischer Hemmung in Gegenwart von THG bzw. CPA bestimmt. Es wurde deutlich, dass die metabolische Hemmung der Glykolyse in Gegenwart von THG oder CPA eine deutliche Steigerung der Anstiegsgeschwindigkeit von $[Ca^{2+}]_i$ bewirkte. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Abnahmegeschwindigkeit von $[Ca^{2+}]_i$ nach Überschreitung des $[Ca^{2+}]_i$ -Maximums verlangsamt war. Diese Ergebnisse unterstützen die Schlussfolgerungen, dass in der Anfangsphase einer metabolischen Hemmung die ER- Ca^{2+} -ATPase aktiviert ist. Erst im späteren Verlauf der Phase 1 scheint die Aktivität der ER- Ca^{2+} -ATPase abzunehmen.

Inositoltrisphosphat- und Ryanodinrezeptoren

Da die Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das ER nicht inaktiviert ist, liegt die Annahme nahe, dass die Aktivierung eines Ca^{2+} -Freisetzungsmechanismus aus dem ER die Ursache für den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg in Phase 1 ist. Als Mechanismen kommen zwei Ca^{2+} -Freisetzungskanäle in Frage: Die Inositoltrisphosphat (IP_3R)- und die Ryanodinrezeptoren (RyR) (Ziegelstein et al., 1994; Gafni et al., 1997). Die Zugabe von Ryanodin als Hemmstoff der RyR (Sorrentino, 1995) hatte auf die Ca^{2+} -Freisetzung nach glykolytischer Hemmung keinen Einfluss. Diese Befunde sprechen dafür, dass RyR unter diesen Bedingungen nicht an einer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER beteiligt sind. Möglicherweise spielt die Ca^{2+} -Freisetzung via RyR nur unter bestimmten Bedingungen eine Rolle, wie z.B. bei der Steigerung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während einer Ischämie oder induziert durch Mediatoren (Ziegelstein et al., 1994; Ladilov et al., 2000).

In Endothelzellen, die in Gegenwart von Xestospongin C, ein spezifischer Hemmstoff der IP_3R , inkubiert wurden, war dagegen der 2-DG-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg aufgehoben. Gleiche Ergebnisse wurden auch in Experimenten erzielt, in denen NaCN zur metabolischen Hemmung eingesetzt wurde. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER von der Öffnung der IP_3R abhängig ist. Dabei ist der hierfür verantwortliche Mechanismus unklar.

Es wurde bereits früher für andere Zelltypen beschrieben, dass IP_3R durch einen Abfall der lokalen ATP-Konzentration aktiviert werden können (Smith et al., 1985; Ferris et al., 1990; Curry, 1992). Somit liegt auch hier die Vermutung nahe, dass nach metabolischer Hemmung in Endothelzellen die Öffnungswahrscheinlichkeit der IP_3R zunimmt. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die Synthese von IP_3 gesteigert wird. IP_3 ist ein sekundärer Botenstoff, der durch seine Kurzlebigkeit nur einen lokal begrenzten Aktionsradius besitzt (Berridge et al., 2000). Es kann aber durch eine Ca^{2+} -abhängige Kinase zu weiteren Botenstoffen umgewandelt werden, wie z.B. dem Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat (IP_4). Von IP_4 ist gezeigt worden, dass es über Bindung an GTPase-aktivierende Proteine der Ras-Familie die Ca^{2+} -Freisetzung modulieren kann (Cullen, 1998).

Store-operated calcium entry

Ein ganz wesentlicher Befund in diesem Zusammenhang ist, dass XeC nicht nur den Phase 1- $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg, sondern auch den Phase 2-Anstieg aufhob. Das zeigt, dass der Ca^{2+} -Einstrom, der den zweiten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ verursacht, indirekt von der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER abhängig ist. Demnach findet nach metabolischer Hemmung in Endothelzellen zunächst eine Ca^{2+} -Freisetzung über den IP_3 -Kanal statt und anschließend kommt es zu einem Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran. Dieser Ca^{2+} -Einstrom könnte auf einem kapazitativen oder *store-operated Ca^{2+} -entry*-Mechanismus (SOC) beruhen, wie er bereits in Endothelzellen als Reaktion auf verschiedene Rezeptoragonisten beobachtet wurde (Dutta, 2000). Eine Analyse dieses Einstrommechanismus in metabolisch gehemmten Endothelzellen wurde in dieser Studie nicht durchgeführt.

Es existieren aber verschiedene Hypothesen, die von direkten oder indirekten Kopplungsmechanismen ausgehen. Eine indirekte Kopplung setzt die Existenz eines diffusiblen Botenstoffs voraus, wie z.B. den Ca^{2+} -Influx-Faktor (Randriamampita und Tsien, 1993), Cytochrom P450 Metaboliten (Alvarez et al., 1991), cGMP (Pandol und Schoeffield-Payne, 1990) oder kleine GTP-bindende Proteine (Rosado und Sage, 2000). Ein Modell der direkten Kopplung, dem „conformational coupling“, postuliert eine physikalische Interaktion zwischen dem ER und der Plasmamembran (Irvine, 1990; Berridge, 1995). Und schließlich wird für Glattmuskelzelllinien und menschlichen Thrombozyten ein „secretion-like-coupling“ Modell vorgeschlagen, das auf einer reversiblen Kopplung des ER mit der Plasmamembran basiert. Dazu muss eine Verlagerung des ER zur Plasmamembran stattfinden (Patterson et al., 1999; Rosado et al., 2000).

Verschiedene Autoren setzten voraus, dass *Säugerorthologe des Drosophila transient receptor potential Proteine* (TRP) die Ca^{2+} -Einstromkanäle bilden. (Ma et al., 2000; Roderick und Bootman, 2003; Trebak et al., 2003). Aktuelle Untersuchungen brachten allerdings neue Erkenntnisse über die Mechanismen, die sich hinter dem SOC verbergen. Taylor (2006) beschrieb, dass nach etwa 20 Jahren intensiver Forschung zwei Proteine identifiziert wurden, die eine zentrale Funktion für den SOC besitzen: Stromal-interacting protein 1 (STIM1), als Ca^{2+} -Sensor, und Orai1, als Ca^{2+} -Kanal. STIM1 ist ein integrales Membranprotein am ER und an der Plasmamembran, das nur eine transmembranale Region besitzt. Die zytosolische C-

terminale Region zeigt zahlreiche Phosphorylierungsstellen und Domänen zur Interaktion mit anderen Proteinen. Am ER bildet STIM1 luminal am N-terminalen Ende neben dem sterile motif- α (SAM) die so genannte EF-Hand, die als Ca^{2+} -Sensor für die Ca^{2+} -Konzentration im ER fungiert. Vermutlich durchzieht Orai1 die Plasmamembran mit vier Regionen und bildet zwei Schleifen im Extrazellulärraum. Das N- und das C-terminale Ende befinden sich im Zytosol. Detektiert die EF-Hand von STIM1 einen Ca^{2+} -Verlust im ER, konzentriert sich das Protein und wandert zu Regionen im ER, die nahe an der Plasmamembran liegen. Möglicherweise reagiert STIM1 unmittelbar mit Orai1 oder beide Proteine kommunizieren über deren coiled-coil Domänen. In der Folge bildet Orai1 den Ca^{2+} -Kanal für den Ca^{2+} -Einstrom. Ong et al. (2007) postulieren, dass für den Ca^{2+} -Einstrom zusätzlich zu STIM1 und Orai1 der TRP1-Kanal (transient receptor potential channel) notwendig ist. Dabei ist die Frage noch ungeklärt, wie diese drei Proteine miteinander agieren, um den Ca^{2+} -Einstromkanal zu bilden.

Dass TRP-Kanäle eine besondere Bedeutung in Endothelzellen für die Regulation des Ca^{2+} -Einstroms aus dem Extrazellulärraum unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen, wie z.B. dem oxidativen Stress oder der Ischämie-Reperfusion haben, zeigen aktuelle Arbeiten von Peters und Piper (2007) und Hecquet et al. (2008).

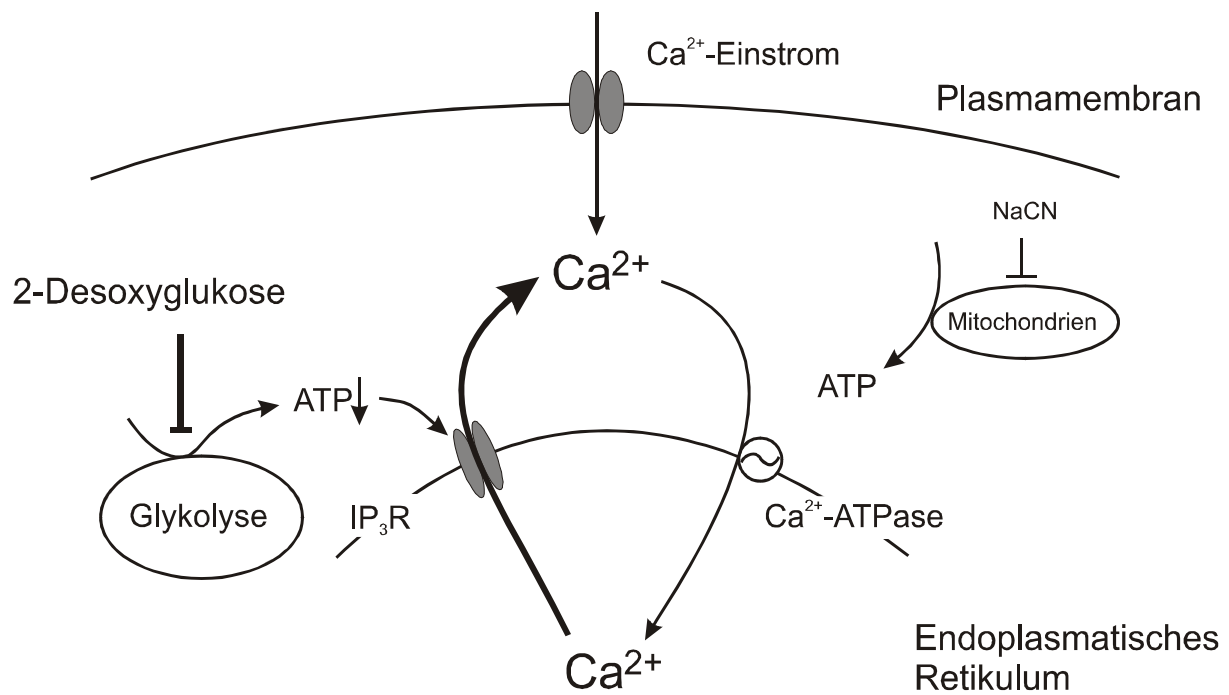


Abbildung 4.1:

Schematische Darstellung der Mechanismen für den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in metabolisch gehemmten Endothelzellen.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchung ergibt sich folgendes Szenario: In Phase 1 des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs steigert die metabolische Hemmung der Glykolyse durch 2-DG die Ca^{2+} -Freisetzung über die IP_3R . Dabei bleibt die Ca^{2+} -Rückspeicherung via Ca^{2+} -ATPase erhalten. Die Hemmung der mitochondrialen ATP-Produktion scheint für die Ca^{2+} -Freisetzung nicht im gleichen Maße von Bedeutung zu sein. Der Phase 2- $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg resultiert aus einem Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran.

Verlust der endothelialen Schrankenfunktion

Die besondere Bedeutung der $[Ca^{2+}]_i$ -Überladung für das Schrankenversagen zeigten die Experimente, in denen die Lückenbildung zwischen den Endothelzellen untersucht wurde. Bereits mit dem Einsetzen der metabolischen Hemmung kam es zeitgleich mit dem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg zu einer Bildung interendothelialer Lücken. Die Koinzidenz beider Prozesse bestätigt das gut etablierte Konzept, dass $[Ca^{2+}]_i$ und Schrankenfunktion kausal verknüpft sind (Curry, 1992). Auch in neueren Untersuchungen von Gündüz et al. (2003 und 2006), die unter identischen

Bedingungen wie in dieser Studie durchgeführt wurden, bestätigen diese Ergebnisse. Wesentliche Mechanismen sind dabei einmal die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung des kontraktile Apparats und die Störung der Zell-Zell-Adhäsionen. Ein weiterer ganz entscheidender Befund dieser Arbeit ist, dass der Hemmstoff der IP_3R , XeC , sowohl den biphasischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg als auch die Lückenbildung aufhob.

Die interendotheliale Lückenbildung tritt schon zu einem frühen Zeitpunkt der zellulären Energieverarmung auf. Dafür ist vor allem der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg verantwortlich, und nicht nur der partielle Energieverlust (Noll et al., 1995; Muhs et al., 1997). Endothelzellen verfügen über die kontraktile Elemente F-Aktin, Myosin und Tropomyosin, die teils in Myofibrillen-ähnlichen Strukturen organisiert sind. Durch Aktivierung dieser Elemente wird eine Zugspannung in den Endothelzellen ausgelöst und es entstehen interzelluläre Spalträume, die für eine Hyperpermeabilität des Endothels verantwortlich sind (Kuhne et al., 1993). Voraussetzung für die Kontraktion ist die Anwesenheit ausreichender Mengen ATP (Wysolmerski und Lagunoff, 1988) und eine gesteigerte $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ca^{2+} aktiviert die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Myosin-Leichtketten-Kinase (Schnittler et al., 1990; Wysolmerski und Lagunoff, 1990). In Experimenten hat sich bestätigt, dass der partielle Energieverlust in metabolisch gehemmten Endothelzellen, der die Freisetzung von Ca^{2+} auslöst, für die ATP-Bereitstellung zur Aktivierung des kontraktile Apparats noch nicht kritisch ist (Noll et al., 1995).

Wie auch in dieser Studie an der Lückenbildung zu beobachten ist, setzt sich auch nach der initialen Ca^{2+} -Freisetzung die Hyperpermeabilität des Endothels fort. Da aber mit fortschreitender metabolischer Hemmung die ATP-Reserven der Endothelzellen verbraucht werden, versagt der kontraktile Apparat. Damit ist nur die initiale Permeabilitätssteigerung auf eine Aktivierung des kontraktile Apparats zurückzuführen, im weiteren Verlauf sind aber andere Ursachen dafür verantwortlich. Ein Zellschaden ist zu diesem Zeitpunkt ausgeschlossen, da die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Überladung über eine bis maximal zwei Stunden reversibel ist und erst bei metabolischer Hemmung über diese Zeit hinaus zum Untergang der Endothelzelle führt (Noll et al., 1990).

Im Unterschied zu Endothelzellen nehmen in anderen Zellen, wie z.B. Myozyten und Hepatozyten, unter metabolischer Hemmung die ATP-Reserven schneller ab. Wenn das gesamte ATP verbraucht ist, kommt es durch das Versagen der Ca^{2+} -ATPasen

der Plasmamembran zu einer $[Ca^{2+}]_i$ -Überladung durch Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem extrazellulären Raum. Diese $[Ca^{2+}]_i$ -Überladung ist irreversibel und hat unweigerlich eine Zellschädigung zur Folge (Lemasters et al., 1987; Ladilov et al., 1997).

Mögliche Ursachen für die persistierenden interzellulären Lücken in metabolisch gehemmten Endothelzellen liegen in einer Rigorbindung zwischen Aktin und Myosin nach Verbrauch der ATP-Reserven. Die Zellen würden kontrahiert bleiben und durch ihre abgerundete Form zwischen sich Spalträume entstehen lassen. Eine weitere Möglichkeit könnte eine Destabilisierung von Zell-Zell-Verbindungen nach initialer Aktivierung des Kontraktionsapparats sein. Auch ein Zerfall des Zytoskeletts, das für die Erhaltung der Zellform verantwortlich ist, könnte ein Grund sein.

Durch die interendotheliale Lückenbildung ist die Barrierenfunktion des Endothels massiv beeinträchtigt. Der parazelluläre Stoffaustausch wird gefördert und es entstehen interstitielle Ödeme. Diese Ödeme beeinträchtigen das Gewebe und behindern die Organerholung nach einer Ischämie (Curry, 1992; Noll et al., 1995).

5. Zusammenfassung

Prozesse, die zu einer Hemmung der Energieproduktion führen, rufen in Endothelzellen einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) hervor. Dieser $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg führt zu einer Lückenbildung zwischen den Endothelzellen und damit zu einer Beeinträchtigung der endothelialen Schrankenfunktion. In der vorliegenden Studie wurden die Mechanismen untersucht, die für die Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Homöostase nach metabolischer Hemmung verantwortlich sind. Besonderes Augenmerk wurde auf die Ca^{2+} -Freisetzungsmechanismen des endoplasmatischen Retikulums (ER) gerichtet.

Als Modell dienten kultivierte aortale Endothelzellen und frisch isolierte Endothelzellen auf Aortensegmenten *in-situ* vom Schwein. Die metabolische Hemmung der glykolytischen und / oder der mitochondrialen Energieproduktion durch Zugabe von 2-Desoxyglukose (2-DG, 10 mM) und / oder Natriumcyanid (NaCN, 5 mM) führte zu einem biphasischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg. Dieser $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg ging mit der Bildung interendothelialer Lücken einher. Die Zugabe von Pyruvat (5 mM), um die mitochondriale Energieproduktion zu unterstützen, steigerte den initialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg (Phase 1) und verminderte den folgenden $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg (Phase 2) nach Zugabe von 2-DG. Dagegen hob die Zugabe von Glukose (10 mM), zur Stimulation der glykolytischen Energieproduktion den biphasischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg nach metabolischer Hemmung durch NaCN auf. Gleiches Verhalten wurde auch in frischen Endothelzellen auf Aortensegmenten *in-situ* beobachtet. Der zytosolische ATP-Gehalt änderte sich während des Phase 1- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs nicht. Daraus ergibt sich, dass dieser Phase 1-Anstieg von einer Änderung des gesamten zytosolischen ATP-Gehalts unabhängig ist. Die langsame Entleerung des ER mit Thapsigargin (THG, 10 nM), einem Hemmstoff der ER- Ca^{2+} -ATPase, hob den 2-DG-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg in Phase 1 auf. Daraus lässt sich folgern, dass der Phase 1- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg durch eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER bedingt ist. Der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg in Phase 2 wurde durch einen Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran hervorgerufen. Die gleichzeitige Zugabe von THG und 2-DG verstärkte den 2-DG-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg, was darauf schließen lässt, dass die Ca^{2+} -ATPase in den Zellen, die mit 2-DG behandelt wurden, aktiv war. Xestospongin C (XeC, 3 μM), ein Hemmstoff der Inositoltrisphosphat-Rezeptoren,

hob die $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in Phase 1 und in Phase 2 auf. Außerdem verhinderte XeC die 2-DG-induzierte interendotheliale Lückenbildung.

Die Ergebnisse zeigen, dass die metabolische Hemmung in Endothelzellen zu einem biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg führt. Dabei ist die Hemmung der glykolytischen Energieproduktion für diesen Prozess von entscheidender Bedeutung. Der initiale $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg folgt einer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER über Inositoltrisphosphat-Rezeptoren. Die pharmakologische Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER mit XeC vermag effektiv den biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg zu unterdrücken und einer Bildung von Lücken in metabolisch gehemmten Endothelzellen vorzubeugen.

6. Summary

Manoeuvres leading to inhibition of energy production elicit an increase in the cytosolic Ca^{2+} -concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) of endothelial cells. This $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase triggers gap formation between endothelial cells and thus causes endothelial barrier failure. In the present study the mechanism causing the change in the Ca^{2+} homoeostasis was analysed. Special emphasis was laid on the Ca^{2+} -release mechanism of the endoplasmic reticulum (ER).

Endothelial cells from porcine aorta in culture and native endothelial cells from aortic segments *in situ* were used as models. Metabolic inhibition of glycolytic and / or mitochondrial energy production induced by addition of 2-Desoxy-D-glucose (2-DG, 10 mM) and / or sodium cyanide (NaCN, 5 mM) led to a biphasic $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase. This $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase was accompanied by formation of interendothelial gaps. Pyruvate (5 mM), applied to stimulate oxidative energy production, augmented the initial $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -increase (phase 1) and abolished the second rise of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (phase 2) induced by 2-DG. However, glucose (10 mM), applied to stimulate glycolytic energy production, abolished the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase induced by metabolic inhibition in presence of NaCN. A similar response was observed in native aortal endothelial cells on aortic segments *in situ*. ATP content did not change, during the phase 1- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -increase, indicating that this $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase is independent of the total cellular ATP content. The slow Ca^{2+} discharge of the ER by thapsigargin (THG, 10 nM), an inhibitor of the ER- Ca^{2+} -ATPase, abolished the 2-DG-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase of phase 1, indicating that this $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase is a result of a Ca^{2+} release from the ER. The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase of phase 2 was found to be due to a Ca^{2+} influx via plasma membrane. Simultaneous addition of THG plus 2-DG augmented the 2-DG-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise, indicating that the Ca^{2+} -ATPase is still active in 2-DG exposed cells. Xestospongine C (XeC, 3 μM), an inhibitor of inositol triphosphate receptors at the ER, abolished the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise in phase 1 and phase 2. XeC also abolished 2-DG-induced interendothelial gap formation.

The results demonstrate that metabolic inhibition leads to a biphasic $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase in endothelial cells. Inhibition of glycolytic energy production plays a crucial role in this process. The initial $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase is triggered by a Ca^{2+} -release from the ER via inositol triphosphate receptors. Pharmacological inhibition of the Ca^{2+} release from

the ER by xestospongin C effectively suppresses the biphasic rise in $[Ca^{2+}]_i$ and prevents the formation of gaps in metabolic inhibited endothelial cells.

7. Literatur

1. **Abdallah Y, Gligoriesvski D, Kasseckert SA, Dieterich L, Schäfer M, Kuhlmann CR, Noll T, Sauer H, Piper HM, Schäfer C.** The role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in the autonomous proliferative response of endothelial cells to hypoxia. *Cardiovasc Res* 1; 73(3): 568-574, 2007.
2. **Alvarez J, Montero M, Garcia-Sancho J.** Cytochrome P-450 may link intracellular Ca^{2+} stores with plasma membrane Ca^{2+} influx. *Biochem J* 274: 193-197, 1991.
3. **Ando J, Komatsuda T, Kamiya A.** Cytoplasmic calcium response to fluid shear stress in cultured vascular endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 24: 871-877, 1988.
4. **Berridge MJ.** Capacitative calcium entry. *Biochem* 312: 1-11, 1995.
5. **Berridge MJ, Irvine RF.** Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312: 315-321, 1984.
6. **Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD.** The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 11-21, 2000.
7. **Bezprozvanny I.** The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium* 38: 261-270, 2005.
8. **Bkaily G, Doreleansjuste P, Naik R, Perodin J, Stankova J, Abdulnour E, and Rolapleszczynski M.** Paf Activation of a voltage-gated R-type Ca^{2+} channel in human and canine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol* 110: 519-520, 1993.
9. **Booth C, Koch GL.** Perturbation of cellular calcium induces secretion of luminal ER proteins. *Cell* 59: 729-737, 1989.
10. **Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P.** Calcium signalling – an overview. *Semin Cell Dev Biol* 12(1): 3-10, 2001.
11. **Bootman MD, Lipp P.** Ringing changes to the bell-shaped curve. *Curr Biol* 9: R876-878, 2000.
12. **Bossu JL, Elhamdani A, Feltz A.** Voltage-dependent calcium entry in confluent bovine capillary endothelial cells. *FEBS Lett* 299: 239-242, 1992.
13. **Bossu JL, Elhamdani A, Feltz A, Tanzi F, Aunis D, Thiese D.** Voltage-gated calcium entry in isolated bovine capillary endothelial cells: evidence of a new type of BAY-K 8644-sensitive channel. *Pflügers Arch* 420: 200-207, 1992.

14. **Bossu JL, Feltz A, Rodeau JL, Tanzi F.** Voltage-dependent transient calcium currents in freshly dissociated capillary endothelial cells. *FEBS Lett* 255: 377-380, 1989.
15. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
16. **Busse R, Mülsch A, Fleming I, Hecker M.** Mechanisms of nitric oxide release from the vascular endothelium. *Circulation* 87, Suppl V: V18-25, 1993.
17. **Carafoli E.** Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 56: 395-433, 1987.
18. **Carson MR, Shasby SS, Shasby DM.** Histamine and inositol phosphate accumulation in endothelium: cAMP and a G protein. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 257: L259-L264, 1989.
19. **Catterall WA.** Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* 64: 493-531, 1995.
20. **Cotran RS.** American Association of Pathologists president's address. New roles for the endothelium in inflammation and immunity. *Am J Pathol (United States)* 129(3): 407-413, 1987.
21. **Csordas G, Thomas AP, Hajnoczky G.** Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J* 18(1): 96-108, 1999.
22. **Cullen PJ.** Bridging the GAP in inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate signalling. *Biochim Biophys Acta* 1436: 35-47, 1998.
23. **Curry FE.** Modulation of venular microvessel permeability by calcium influx into endothelial cells. *FASEB J* 6: 2456-2466, 1992.
24. **Dutta D.** Mechanisms of store-operated calcium entry. *J Biosci* 25(4): 397-404, 2000.
25. **Erlinge D, Burnstock G.** P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signalling* 4(1): 1-20, 2008.
26. **Epstein FH.** Regulatory function of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 323(1): 27-36, 1990.
27. **Exton JH.** Role of calcium and phosphoinositides in the actions of certain hormones and neurotransmitters. *J Clin Invest* 75(6): 1753-1757, 1985.

28. **Ferris CD, Hunganir RL, Snyder SH.** Calcium flux mediated by purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in reconstituted lipid vesicles is allosterically regulated by adenine nucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2147-2151, 1990.
29. **Fill M, Copello JA.** Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* 82: 893-922, 2002.
30. **Furchgott RF, Vanhoutte PM.** Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 3: 2007-2018, 1993.
31. **Furuichi T, Yoshikawa S, Miyawaki A et al.** Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature* 342: 323-338, 1989.
32. **Gafni J, Munsch JA, Lam TH, Catlin MC, Costa LG, Molinski TF, Pessah IN.** Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* 19: 723-733, 1997.
33. **Garcia JG, Davis HW, Patterson CE.** Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol* 163: 510-522, 1995.
34. **Gaudreault N, Scriven DR, Laher I, Moore ED.** Subcellular characterization of glucose uptake in coronary endothelial cells. *Microvascular Research* 75: 73-82, 2008.
35. **Gaudreault N, Scriven DR, Moore ED.** Characterisation of glucose transporters in the intact coronary artery endothelium in rats: GLUT-2 upregulated by long-term hyperglycaemia. *Diabetologia* 47(12): 2081-2098, 2004.
36. **Granger DN, Korthuis RJ.** Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol (United States)* 57: 311-332, 1995.
37. **Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY.** A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450, 1985.
38. **Gündüz D, Hirche F, Härtel FV, Rodewald CW, Schäfer M, Pfitzer G, Piper HM, Noll T.** ATP antagonism of thrombin-induced endothelial barrier permeability. *Cardiovasc Res* 1; 59(2): 470-478, 2003.
39. **Gündüz D, Kasseckert SA, Härtel FV, Aslam M, Abdallah Y, Schäfer M, Piper HM, Noll T, Schäfer C.** Accumulation of extracellular ATP protects

- against acute reperfusion injury in rat heart endothelial cells. *Cardiovasc Res* 71: 764-773, 2006.
40. **Gunter TE, Pfeiffer DR.** Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 258: C755-786, 1990.
 41. **Hecquet CM, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB.** Role of TRPM2 channel in mediating H₂O₂-induced Ca²⁺ entry and endothelial hyperpermeability. *Circ Res* 15: 102(3): 275-277, 2008.
 42. **Irvine RF.** "Quanta" Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol phosphates – a possible mechanism. *FEBS Lett* 263: 5-9, 1990.
 43. **Jaffe EA, Grulich J, Weksler BB, Hampel G, Watanabe K.** Correlation between thrombin-induced protacyclin production and inositol trisphosphate and cytosolic free calcium levels in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 262: 8557-8565, 1987.
 44. **Jüngling E and Kammermeier H.** Rapid assay of adenine nucleotides or creatine compounds in extracts of cardiac tissue by pair-ion reversed-phase high performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 102: 358-361, 1980.
 45. **Koch GL.** Reticuloplasmins: a novel group of proteins in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 87: 491-492, 1987.
 46. **Kubes P.** Nitric oxide-induced microvascular permeability alterations: a regulatory role for cGMP. *Am J Physiol* 265: H1909-H1915, 1993.
 47. **Kubes P, Granger DN.** Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am J Physiol* 262: H611-H615, 1992.
 48. **Kuhne W, Besselmann M, Noll T, Muhs A, Watanabe H, Piper HM.** Desintegration of cytoskeletal structure of actin filaments in energy-depleted endothelial cells. *Am J Physiol* 264: H1599-H1608, 1993.
 49. **Ladilov YV, Schäfer C, Held A, Schäfer M, Noll T, Piper HM.** Mechanism of Ca²⁺ overload in endothelial cells exposed to stimulated ischemia. *Cardiovasc Res* 47: 394-403, 2000.
 50. **Ladilov YV, Siegmund B, Balser C, Piper HM.** Stimulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture. *Circ Res* 80: 69-75, 1997.
 51. **Lemasters JJ, Di Guiseppi J, Nieminen AL et al.** Blebbing, free Ca²⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* 325(6099): 78-81, 1987.

52. **Lesh RE, Marks AR, Somlyo AV, Fleischer S, Somlyo AP.** Anti-ryanodine receptor antibody binding sites in vascular and endocardial endothelium. *Circ Res* 72: 481-488, 1993.
53. **Li Q, Altschuld A, Stokes BT.** Quantification of intracellular free calcium in single adult cardiomyocytes by fura-2 fluorescence microscopy: calibration of fura-2 ratios. *Biochem Biophys Res Commun* 147: 120-126, 1987.
54. **Lum H, Aschner JL, Phillips PG, Fletcher PW, Malik AB.** Time course of thrombin-induced increase in endothelial permeability: relationship to Ca^{2+}_i and inositol polyphosphates. *Am J Physiol* 263: L219-L225, 1992.
55. **Ma HT, Patterson RL, van Rossum DB, Birnbaumer L, Mikoshiba K, Gill DL.** Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Science* 287: 1647-1651, 2000.
56. **Majno G, Palade GE.** Studies on inflammation I. Effect of histamine and serotonin on vascular permeability. An electron microscopic study. *J Biophys Biochem Cytol* 11: 571-606, 1961.
57. **Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L.** Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev* 83: 183-252, 2003.
58. **Martin W, Cusack NJ, Carleton JS, Gordon JL.** Specificity of P2-purinoceptor that mediates endothelium-dependent relaxation of the pig aorta. *Eur J Pharmacol* 108: 295-299, 1985.
59. **Michel CC.** Transport of macromolecules through microvascular walls. *Cardiovasc Res* 32: 644-653, 1996.
60. **Moncoq K, Trieber CA, Young HS.** The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *J Biol Chem* 282: 9748-9757, 2007.
61. **Morgan Boyd R, Stewart JM, Vavrek RJ, Hassid A.** Effects of bradykinin and angiotensin II on intracellular Ca^{2+} dynamics in endothelial cells. *Am J Physiol* 253: C588-C598, 1987.
62. **Muhs A, Noll T, Piper HM.** Vinculin phosphorylation and barrier failure of coronary endothelial monolayers under energy depletion. *Am J Heart Circ Physiol* 273: H608-H617, 1997.

63. **Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF.** Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis* 11: 109-119, 2008.
64. **Newby AC, Henderson AH.** Stimulus-secretion coupling in vascular endothelial cells. *Ann Re Physiol* 52: 661-674, 1990.
65. **Nicholls DG.** Bioenergetics. An Introduction to the chemiosmotic theory. *Academic Press (London)*, 1982.
66. **Nilius B, Droogmans G.** Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* 81(4): 1415-1459, 2001.
67. **Noll T, Muhs A, Besselmann M, Watanabe H, Piper HM.** Initiation of hyperpermeability in energy-depleted coronary endothelial monolayers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 268: H1462-H1470, 1995.
68. **Noll T, Wissemann P, Mertens S, et al.** Hypoxia tolerance of coronary endothelial cells. *Adv Exp Med Biol* 277: 467-476, 1990.
69. **Oldershaw KA, Taylor CW.** Luminal Ca^{2+} increases the affinity of inositol 1,4,5-triphosphate for its receptor. *Biochem J* 292: 631-633, 1993.
70. **Ong HL, Cheng KT, Liu X, Bandyopadhyay BC, Paria BC, Soboloff J, Pani B, Gwack Y, Srikanth S, Sing BB, Gill D, Ambudkar IS.** Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. *J Biol Chem* 282(12): 9105-9116, 2007.
71. **Pandol SJ, Schoeffield-Payne MS.** Cyclic GMP mediates the agonist-stimulated increase in plasma membrane calcium entry in the pancreatic acinar cell. *J Biol Chem* 265: 12846-12853, 1990.
72. **Patterson RL, van Rossum DB, Gill DL.** Store-operated Ca^{2+} entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell* 98: 487-499, 1999.
73. **Pearson JD, Slakey LL, Gordon JL.** Stimulation of prostaglandin production through purinoceptors on cultured porcine endothelial cells. *Biochem J* 214: 273-276, 1983.
74. **Peters S, Piper HM.** Reoxygenation-induced Ca^{2+} rise is mediated via Ca^{2+} influx and Ca^{2+} release from endoplasmatic reticulum in cardiac endothelial cells. *Cardiovasc Res* 73(1): 164-171, 2007.
75. **Pohl U, Kaas J.** Interactions of hormones with the vascular endothelium. Effects on the control of vascular tone. *Arzneimittelforschung (Germany)* 44(3A): 459-461, 1994.

76. **Randriamampita C, Tsien RY.** Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature (London)* 364: 809-813, 1993.
77. **Rippe B, Haraldsson B.** Transport of macromolecules across microvascular walls: the two-pore theory. *Physiol Rev* 74: 163-219, 1994.
78. **Roderick HL, Bootman MD.** Calcium influx: Is Homer the missing link? *Current Biology Vol 13*: R976-978, 2003.
79. **Rosado JA, Jenner S, Sage SO.** A role for the actin cytoskeleton in the initiation and maintenance of store-mediated calcium entry in human platelets. Evidence for conformation coupling. *J Biol Chem* 275: 7527-7533, 2000.
80. **Rosado JA, Sage SO.** Farnesylcysteine analogues inhibit store-regulated Ca^{2+} entry in human platelets: evidence for involvement of small GRP-binding proteins and actin cytoskeleton. *Biochem J* 346: 183-192, 2000.
81. **Rotrosen D, Gallin JI.** Histamine type I receptor occupancy increases endothelial cytosolic calcium, reduces F-actin and promotes albumin diffusion across cultured endothelial monolayers. *J Cell Biol* 103: 2379-2387, 1986.
82. **Sambrook JF.** The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum. *Cell* 61: 197-199, 1990.
83. **Schäfer C, Walther S, Schäfer M, Dieterich L, Kasseckert SA, Abdallah Y and Piper HM.** Inhibition of contractile activation reduces reoxygenation-induced endothelial gap formation. *Cardiovasc Res* 58: 149-155, 2003.
84. **Schilling WP, Cabello OA, Rajan L.** Depletion of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive intracellular Ca^{2+} store in vascular endothelial cells activates the agonist-sensitive Ca^{2+} -influx pathway. *Biochem J* 284: 521-530, 1992.
85. **Schnittler NJ, Wilke A, Gress T, Suttorp N, Drenckhahn D.** Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium *J Physiol* 431: 379-401, 1990.
86. **Sedova M, Blatter LA.** Dynamic regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by plasma membrane Ca^{2+} -ATPase and $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ exchange during capacitative Ca^{2+} entry in bovine vascular endothelial cells. *Cell Calcium* 25: 333-343, 1999.
87. **Serysheva II, Hamilton SL.** Ryanodine binding sites on the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel, in structure and function of ryanodine

- receptors (Sitsapesan R, Willaims AJ, eds) *Imperial College Press* 95-104, 1998.
88. **Shen J, Luscinskas FW, Connolly A, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr.** Fluid shear stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 262: C384-C390, 1992.
 89. **Smith JB, Smith L, Higgins BL.** Temperature and nucleotide dependence of calcium release by myo-inositol 1,4,5-trisphosphate in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 260: 14413-14416, 1985.
 90. **Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, des Rosiers MH, Patlak XS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M.** The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: Theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *Journal of Neurochemistry* 28: 897-916, 1977.
 91. **Sorrentino V.** The ryanodine receptor family of intracellular calcium release channels. *Adv Pharmacol* 33: 67-90, 1995.
 92. **Spahr R, Piper HM.** Microcarrier cultures of endothelial cells. In: *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*, edited by Piper HM. *Heidelberg: Springer-Verlag* p. 220-229, 1990.
 93. **Streb H, Irvine RF, Berridge MJ et al.** Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306: 67-69, 1983.
 94. **Sunnergren KP, Rovetto MJ.** Myocyte and endothelial injury with ischemia reperfusion in isolated rat hearts. *Am J Physiol* 252: H1211-H1217, 1987.
 95. **Svensen JH, Bjerrum PJ, Haunso S.** Myocardial capillary permeability after regional ischemia and reperfusion in vivo canine heart. *Circ Res* 68: 174-184, 1991.
 96. **Svensjo E, Arfors KE, Raymond RM, Grega GJ.** Morphological and physiological correlation of bradykinin-induced macromolecular efflux. *Am J Physiol* 236: H600-H606, 1979.
 97. **Szlufcik K, Missiaen L, Parys JB, Callewaert G, De Smedt H.** Uncoupled IP₃ receptor can function as a Ca²⁺-leak channel: cell biological and pathological consequences. *Biol Cell* 98: 1-14, 2006.
 98. **Tarroni P, Rossi D, Conti A, Sorrentino V.** Expression of the ryanodine receptor type 3 calcium release channel during development and

- differentiation of mammalian skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 272(32): 19808-19813, 1997.
99. **Taylor CW.** Store-operated Ca^{2+} entry: a STIMulating stOrai. *TRENDS in Biochemical Sciences* 31: 11, 2006.
 100. **Taylor CW, Genazzani AA, Morris SA.** Expression of inositol trisphosphate receptors. *Cell Calcium* 26: 237-251, 1999.
 101. **Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP.** Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2466-2470, 1990.
 102. **Thastrup O, Dawson AP, Scharff O, Foder B, Cullen PJ, DrØbak BK, Bjerrum PJ, Christensen SB, Hanley MR.** Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions* 27: 17-23, 1989.
 103. **Tran QK, Ohashi K, Watanabe H.** Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 48(1): 13-22, 2000.
 104. **Trebak M, Vazquez G, Bird GS, Putney JW Jr.** The TRPC 3/6/7 subfamily of cation channels. *Cell Calcium* 33: 451-461, 2003.
 105. **Trepakova ES, Cohen RA, Bolotina VM.** Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic / endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase-dependent refilling of Ca^{2+} stores. *Circulation Res* 84: 201-209, 1999.
 106. **Vaca L, Kunze DL.** Depletion of intracellular Ca^{2+} stores activates a Ca^{2+} -selective channel in vascular endothelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 3267: C920-C925, 1994.
 107. **Van Coevorden A, Boeynaems JM.** Physiological concentrations of ADP stimulate the release of prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. *Prostaglandins* 27: 615-626, 1984.
 108. **Varadi A, Cirulli V, Rutter GA.** Mitochondrial localization as a determinant of capacitative Ca^{2+} entry in HeLa cells. *Cell Calcium* 36: 499-508, 2004.
 109. **Vinet R, Vargas FF.** L- and T-type voltage-gated Ca^{2+} currents in adrenal medulla endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 276: H1313-H1322, 1999.

110. **Watanabe H, Kuhne W, Schwartz P, Piper HM.** A2-adenosine receptor stimulation increases macromolecule permeability of coronary endothelial cells. *Am J Physiol* 262: H1174-H1181, 1992.
111. **Wilson MT, Antonini G, Malatesta F, Sarti P, Brunori M.** Probing the oxygen binding site of cytochrom c oxidase by cyanide. *J Biol Chem* 269(39): 24114-24119, 1994.
112. **Wysolmerski RB, Lagunoff D.** Inhibition of endothelial cell retraction by ATP depletion. *Am J Pathol* 132: 28-37, 1988.
113. **Wysolmerski RB, Lagunoff D.** Involvement of myosin light-chain kinase in endothelial cell retraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 16-20, 1990.
114. **Xu KY, Zweier JL, Becker LC.** Functional coupling between glycolysis and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport. *Circ Res* 77: 88-97, 1995.
115. **Yamada N, Makino Y, Clark RA, Pearson DW, Mattei MG, Guénet JL, Ohama E, Fujino I, Miyawaki A, Furuichi T, et al.** Human inositol 1,4,5-trisphosphate type 1 receptor, InsP_3 R1: structure, function, regulation of expression and chromosomal localization. *Biochem J* 302: 781-790, 1994.
116. **Yamamoto-Hino YM, Sugiyama T, Hikichi K, Mattei MG, Hasegawa K, Sekine S, Sakurada K, Miyawaki A, Furuichi T, Hasegawa M, et al.** Cloning and characterization of human type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Recept Channel* 2(1): 9-22, 1994.
117. **Zeithor AM.** Endothelial modulation of coronary vasomotor tone in humans / Effect of atherosclerosis and risk factors for coronary artery disease. *Drug Res* 44(1) 3a: 439-442, 1994.
118. **Ziegelstein RC, Cheng L, Aversano T, Ouyang P, Lakatta EG, Silverman HS.** Increase in rat aortic endothelial free calcium mediated by metabolically sensitive calcium release from endoplasmic reticulum. *Cardiovasc Res* 28: 1433-1439, 1994.
119. **Ziegelstein RC, Spurgeon HA, Pili R, Passaniti A, Cheng L, Corda S, Lakatta EG, Capogrossi MC.** A functional ryanodine-sensitive intracellular Ca^{2+} store is present in vascular endothelial cells. *Circ Res* 74: 151-156, 1994.
120. **Zima AV, Kockskämper J, Mejia-Alvarez R, Blatter LA.** Pyruvate modulates cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in rats via mitochondria-dependent and -independent mechanisms. *J Physiol* 550: 765-83, 2003.

Auszüge dieser Arbeit wurden unter folgendem Titel veröffentlicht: **Schäfer M, Bahde D, Bosche B, Ladilov Y, Schäfer C, Piper HM, Noll T.** Modulation of early $[Ca^{2+}]_i$ rise in metabolically inhibited endothelial cells by xestospongine C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1002-H1010, 2001.

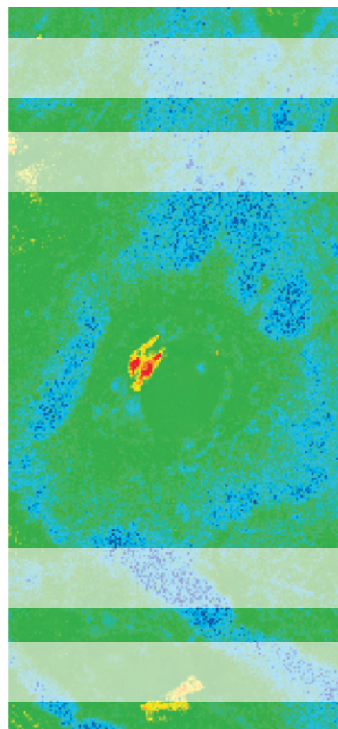
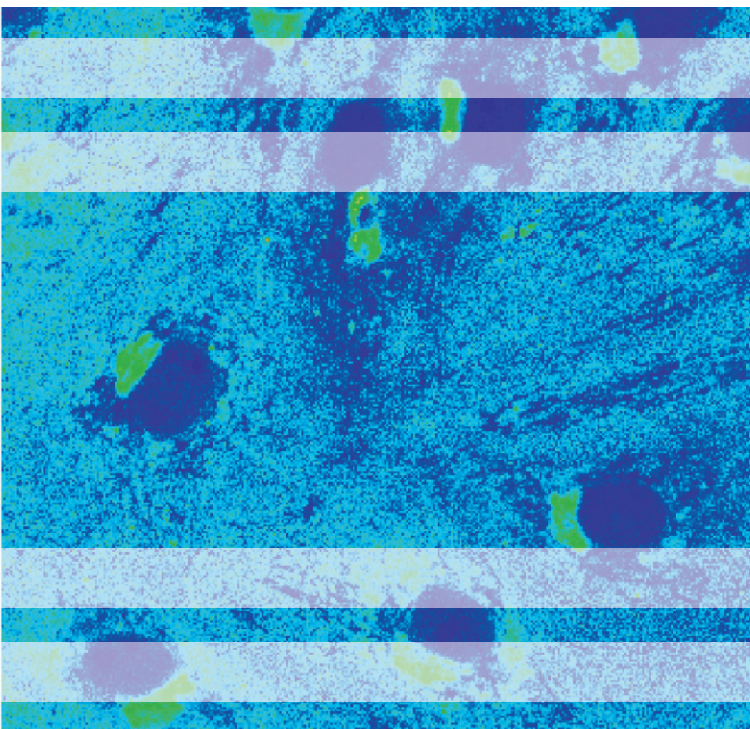
Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Danksagung

Ich möchte allen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts in Gießen für die kollegiale Zusammenarbeit danken, allen voran Herrn PD Dr. Thomas Noll und Herrn Prof. Dr. Dr. Michael Piper.

Der größte Dank aber gilt meiner Familie für ihre Geduld.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5554-3

